

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷
C12N 15/80
C12N 15/65 C12N 15/52
C12N 1/15



[12] 发 明 专 利 说 明 书

[21] ZL 专利号 98805237.7

[45] 授权公告日 2004 年 10 月 6 日

[11] 授权公告号 CN 1169961C

[22] 申请日 1998.4.9 [21] 申请号 98805237.7
[30] 优先权
[32] 1997. 4. 11 [33] EP [31] 97201091.2
[86] 国际申请 PCT/EP1998/002070 1998.4.9
[87] 国际公布 WO1998/046772 英 1998.10.22
[85] 进入国家阶段日期 1999.11.18
[71] 专利权人 DSM 公司
地址 荷兰海尔伦
[72] 发明人 G·C·M·塞尔坦
B·W·斯温凯尔斯
R·A·L·博温伯格
审查员 姜 涛

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利
商标事务所
代理人 黄革生

权利要求书 3 页 说明书 80 页 附图 69 页

[54] 发明名称 基因转变作为工具用于构建重组的
工业化丝状真菌

[57] 摘要

本发明涉及这样的丝状真菌，它们的基因组中包含适于整合一个或多个拷贝重组 DNA 分子的至少两个基本同源 DNA 区，且其中至少有两个这样的 DNA 区包含了重组 DNA 分子的整合拷贝。本发明还涉及制备这种丝状真菌的方法及通过基因转变或扩增进一步增加带有整合重组 DNA 分子的 DNA 区的方法。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 一种丝状真菌，在其染色体的两个基本同源的 DNA 区的至少其一之中整合有重组 DNA 分子，其中所述 DNA 区不是核糖体 DNA 重复序列。

2. 权利要求 1 的丝状真菌，其中每个基本同源的 DNA 区中均整合有重组 DNA 分子。

3. 权利要求 1 或 2 的丝状真菌，其中这些 DNA 区为扩增子。

4. 权利要求 1 的丝状真菌，其中所述 DNA 区是在其天然状态下包含能高水平表达的内源基因的一个区。

5. 权利要求 4 的丝状真菌，其中该内源基因选自以下组：糖酵解酶基因，淀粉分解酶基因，纤维素分解酶基因和抗生素生物合成酶基因。

6. 权利要求 5 的丝状真菌，其中该内源基因选自以下组：葡糖淀粉酶基因，TAKA 淀粉酶基因，纤维二糖水解酶基因和青霉素生物合成酶基因。

7. 权利要求 4 至 6 中任一项的丝状真菌，其中该内源基因在所述 DNA 区的每个拷贝中均失活。

8. 权利要求 7 的丝状真菌，其中该内源基因是通过使其至少一部分不可逆地缺失而失活的。

9. 权利要求 8 的丝状真菌，其中该不可逆缺失包含启动子和上游激活序列的至少部分。

10. 权利要求 1 的丝状真菌，其中所述 DNA 区的每一版本区别于其它版本的是特有的序列标记。

11. 权利要求 10 的丝状真菌，其中该序列标记是一个限制位点。

12. 权利要求 1 的丝状真菌，其中该重组 DNA 分子包含可表达所需基因的表达式。

13. 权利要求 12 的丝状真菌，其中该所需基因编码一种分泌型酶。

14. 权利要求 12 的丝状真菌，其中该所需基因编码一种胞内酶。

15. 权利要求 14 的丝状真菌，其中包含一个或多个胞内酶表达盒的

一个或多个重组 DNA 分子整合在所述 DNA 区内,且所述胞内酶是该丝状真菌天然不具有的代谢途径的一部分。

16. 权利要求 15 的丝状真菌,其中所述胞内酶选自脱乙酰氧基头孢菌素 C 合成酶和脱乙酰基头孢菌素 C 合成酶。

17. 权利要求 1 的丝状真菌,其中该重组 DNA 分子缺乏选择标记基因。

18. 权利要求 17 的丝状真菌,它缺乏选择标记基因。

19. 权利要求 1 的丝状真菌,它属于从下组中选出的属:曲霉属,木霉属,青霉属,头孢属,枝顶孢属,镰孢属,毛霉属,酒曲菌属,*Phanerochaete*,脉孢菌属,腐质霉属,麦角属,粪壳属,黑粉菌属,裂褶菌属,布拉霉属,被孢霉属,须霉属,和弯颈霉属。

20. 权利要求 19 的丝状真菌,选自以下组合:黑曲霉类,米曲霉,*Trichoderma reesei* 和产黄青霉。

21. 制备权利要求 1 至 20 中任何一项的丝状真菌的方法,其中该方法包括的步骤有:

(a)用重组 DNA 分子转化其一条或多条染色体中有至少两个适于整合一个或多个拷贝重组 DNA 分子的基本同源 DNA 区的丝状真菌,其中这些 DNA 区不是核糖体 DNA 重复序列;

(b)选出有至少一个重组 DNA 分子整合在至少其中一个 DNA 区的转化体;

(c)增殖(b)中所获转化体,从其子代选出其中至少两个 DNA 区包含整合重组 DNA 分子的菌株。

22. 权利要求 21 的方法,其中除了步骤(a),(b)和(c)以外,还包括以下步骤:

(d)增殖其中至少两个 DNA 区包含整合 DNA 分子的菌株,从其子代选出其中另外拷贝的 DNA 区也包含整合重组 DNA 分子的菌株;

(e)重复步骤(d)直至获得其中每个 DNA 区均包含整合重组 DNA 分子的菌株。

23. 权利要求 21 或 22 的方法,其中该重组 DNA 分子包含基本同源

于所述 DNA 区的序列。

24. 权利要求 21 或 22 的方法，其中利用双向选择标记在步骤(a)中转化丝状真菌，且在执行步骤(c)之前，选择缺失了双向选择标记的转化子。

25. 权利要求 24 的方法，其中所述双向选择标记为显性标记。

26. 生产目的蛋白质的方法，包括的步骤有：

(a) 在有利于目的蛋白质表达的条件下培养权利要求 1 至 20 中任何一项的丝状真菌，并

(b)回收目的蛋白质。

27. 权利要求 26 的方法，其中目的蛋白质为分泌型蛋白质。

28. 产生目的代谢物的方法，包括的步骤有：

(a)在有利于目的代谢物生产的条件下培养权利要求 1 至 20 中任一项的丝状真菌；并

(b)回收目的代谢物。

29. 权利要求 28 的方法，其中目的代谢物是一种次级代谢物。

基因转变作为工具用于构建重组的工业化丝状真菌

发明领域

本发明涉及用于工业化发酵工艺的微生物的遗传工程。

发明背景

在工业化大生产中通过微生物发酵生产的产品不断增多。这些产品的范围从初级和次级代谢产物，分别举例如柠檬酸和抗生素，到蛋白质，酶，甚至完整微生物，例如面包酵母或生物质的形式。按惯例，所用的微生物已接受了经典性菌株改良程序，这些程序包括连续多轮诱变及随后选择具有改良性能的突变体。最近，遗传工程，即重组 DNA 技术也已经应用于工业化微生物。该技术不仅能进一步提高由所述微生物天然产生的产品的生产水平，而且能开发全新产品和/或生产工艺，举例如异源蛋白质的生产或代谢途径的改造。

遗传工程要求将重组 DNA 分子导入目的生物体中并通常还要表达。该过程称为转化。微生物的稳定转化要求导入的重组 DNA 分子在细胞中代代相传，即稳定遗传。原则上有两种方法可保留导入的重组 DNA 分子。第一，重组 DNA 可整合在宿主细胞的基因组中，如整合在其染色体上。一旦整合的重组 DNA 成为该染色体的一部分，就能随该染色体一起复制而被保留。第二，重组 DNA 可作为能自主复制(即独立于宿主基因组的复制)的 DNA 分子的一部分而被导入细胞。这类自主复制型载体通常衍生自适合于容纳重组 DNA 插入的天然质粒或病毒。

就工业化微生物生产用生物体而言，自主的和整合型的载体系统各有其优缺点。例如，自主复制型载体系统对待导入的 DNA 序列的数量和/或长度有严格限制，一般被认为与整合型系统相比较不稳定并常使每个基因拷贝以较低水平表达。更重要的是，对某些十分重要的工业化微生物，主要是丝状真菌如曲霉、青霉或木霉来说，没有稳定的

自主复制型载体系统可供使用。

整合型载体系统的不利之处是整合方法上的某些限制。通过同源重组向预定的基因组序列中整合难以得到高拷贝数的重组 DNA 分子。而多拷贝重组 DNA 分子的随机整合，如丝状真菌中常用的那样，将产生无法预料的转化子基因型。这不仅将导致转化后生产株的优点丧失，而且这类菌株的不可预料且不确定特点将使权威登记机构难以接受。

W091/00920 公布了其中多拷贝重组 DNA 分子整合在核糖体 DNA 重复簇中的酵母菌株。这些重组 DNA 分子(此例中是异源基因的表达载体)额外包含有缺陷选择性标记基因和酵母核糖体 DNA 序列，后者使载体通过同源重组向核糖体 DNA 重复簇中的整合成为可能。缺陷选择性标记基因是选择及稳定维持包含整合在核糖体 DNA 重复簇上的多拷贝载体的菌株所必需的。此外，W091/000920 建议，向核糖体 DNA 重复序列中的多拷贝整合作用可能也可应用于一般性真菌，包括丝状真菌如曲霉。然而，W091/00920 公布的多拷贝整合系统依赖于缺陷选择性标记基因的应用。而且，W091/00920 并未提供向天然适合于支持蛋白质编码基因的高水平 RNA 聚合酶 II 转录的基因组环境中整合的方法。

最近，ES2 094 088 描述了在产黄青霉 E-1 和产黄青霉 AS-P-78 过量产生青霉素的菌株中扩增了的一段 DNA 区。扩增的 DNA 区大小分别被描述为 75kb 和 106kb，并在扩增区内一段 16.5kb 的片段中包含基因 pcbAB, pcbC 和 penDE。有人建议，该扩增区左端和右端的 DNA 序列可用于构建已导入标记基因的载体，从而启动位于它们之间的遗传物质的扩增，尤其可用于经亚硝基胍随机诱变获得青霉素产量较高的菌株，以便使载体一旦整合入微生物的基因组就可增加其拷贝数。然而，ES 2 094 088 没能描述上文简述的方法是否可成功应用。事实上，ES 2 094 088 所述方法有好几点缺陷。例如，复杂 DNA 结构的扩增频率很低。而且亚硝基胍诱变剂的应用将在微生物基因组中同时产生不希望的自发突变。更有甚者，诱变处理可导致载体中扩增区序列的缺失，并因此缺失插入其间的目的基因；也参见 Fierro，美国国家

科学院院报(1995), 6200-6204。还有, 如上所述, 载体向微生物基因组的随机整合将导致不可预料的转化基因型。

因此, 本发明的根本技术难题是提供普遍可用的方法以构建丝状真菌的重组生产株, 该株应包含整合在其基因组中预定靶位点的多拷贝重组 DNA 分子, 而且该系统应不依赖于特殊类型选择性标记的应用就可转化。

图的简述

图中所用缩写:

限制性酶和限制位点:

A = *Apa*I; Ba = *Bam*HI; B = *Bgl*II; Bs = *Bss*HII; E = *Eco*RI; H = *Hind*III; K = *Kpn*I; N = *Nde*I; No = *Not*I; Ps = *Pst*I; P = *Pvu*II; Sa = *Sal*I; Sc = *Sca*I; S = *Sma*I; Sn = *Sna*BI; Spe = *Spe*I; Sp = *Sph*I; Ss = *Sst*II; Xb = *Xba*I; X = *Xho*I; Nr = *Nru*I; Hp = *Hpa*I; Sf = *Sfi*I; Ns = *Nsi*I; Bst = *Bst*XI.

插图说明

图 1: 图示黑曲霉 CBS646.97(于 1997 年 4 月 11 日保藏于真菌菌种保藏中心, Baarn, 荷兰)的转化体(ISO-505)的 *glaA* DNA 扩增子中三个 Δ *glaA* 位点, 每个均用不同的限制位点作标记(*Bam*HI, *Sal*I 或 *Bgl* II)。每个 *glaA* 位点的截短相差近 20 或 60bp, 这样可用基于 PCR 的 DNA 旗试验(DNA-flag test)显示每个截短的 *glaA* 位点。

图 2: 黑曲霉亲代株 CBS646.97(图上半部分)的 *glaA* 位点及黑曲霉重组株 ISO-505 的三个截短的“X 标记” *glaA* 位点(X 代表 *Bam*HI, *Sal*I 或 *Bgl* II 限制位点)的物理图谱。

图 3: 中间载体 pGBGLA16 的构建途径。

图 4: 图示融合 PCR, 以破坏 3'-*glaA* DNA 序列中的 *Kpn*I*, 并在边界加入克隆位点以便恰当地克隆进 pGBGLA16, 产生中间载体 pGBGLA18。

图 5: 图示融合 PCR 使 5'-和 3'-glaA 序列之间包含一个 BamHI 限制位点, 并在边界加入克隆位点以便恰当地克隆进 pGBGLA18, 产生基因置换型载体 pGBDEL5。

图 6: 图示融合 PCR 使 glaA 的 5'-和 3'-序列之间包含一个 SalI 限制位点, 并在边界加入克隆位点以便恰当地克隆进 pGBGLA18 中, 产生基因置换型载体 pGBDEL9。

图 7: 图示融合 PCR 使 glaA 的 5' 和 3' 序列间包含一个 BglIII 限制位点, 并在边界加入克隆位点以便恰当地克隆进入 pGBGLA18 中, 产生基因置换型载体 pGBDEL11。

图 8: 图示分离自黑曲霉亲代株 CBS646.97 的染色体 DNA 用 KpnI 或 BamHI 消化后, 以 Hind III/XhoI 5'-glaA DNA 片段 (a) 或 SalI/SalI 3'-glaA DNA 片段 (b) 为探针所观察到的杂交模式。

图 9: 图示用 KpnI 或 BamHI 消化分离自黑曲霉 CBS646.97 转化体的染色体 DNA 后, 用探针 Hind III/XhoI 5'-glaA DNA 片段 (a) 或 SalI/SalI 3' glaA DNA 片段 (b) 所观察到的杂交模式, 其中线性化 pGBDEL5 载体已通过一个双交换而整合到 glaA 靶位点。在单个转化体的基因组中, 宿主的 3'-glaA 序列中的原始 KpnI 位点可能因双交换重组事件而被破坏(K*), 但并非一定如此。

图 10: 图示分离自无 amdS 选择性标记基因的黑曲霉转化体 GBA-201 的染色体 DNA 用 KpnI 或 BamHI 消化后用探针 Hind III/XhoI 5'-glaA DNA 片段 (a) 或 SalI/SalI 3'-glaA DNA 片段 (b) 的杂交模式, 其中该转化体包含一个“BamHI 标记的” Δ glaA DNA 扩增子和两个完整无损的 glaA 扩增子。

图 11: 图示分离自黑曲霉 GBA-201 转化体的染色体 DNA 用 KpnI 或 BamHI 消化后用探针 Hind III/XhoI 5'-glaA DNA 片段 (a) 或 SalI/SalI 3' glaA DNA 片段 (b) 的杂交模式, 其中线性 pGBDEL9 载体经双交换变成整合型。在单个转化体的基因组中, 宿主的 3' glaA 序列中的原始 KpnI 位点可能因双交换重组事件而被破坏(K*), 但并非一定如此。

图 12: 图示分离自无 *amdS* 选择性标记基因的黑曲霉 GBA-202 转化体的染色体 DNA 用 *KpnI* 或 *BamHI* 消化后用探针 *Hind III/XhoI* 5'-*glaA* DNA 片段(a)或 *SalI/SalI* 3'-*glaA* DNA 片段(b)的杂交模式, 该转化体包含两个“*BamHI* 和 *SalI* 标记的” Δ *glaA* DNA 扩增子和一个仍然无损的 *glaA* 扩增子。

图 13: 图示分离自黑曲霉 GBA-202 转化体的染色体 DNA 用 *KpnI* 或 *BamHI* 消化后用探针 *Hind III/XhoI* 5'-*glaA* DNA 片段(a)或 *SalI/SalI* 3'-*glaA* DNA 片段(b)的杂交模式, 转化体中线性 pGBDEL11 载体已经双交换为整合型。在单个转化体的基因组中, 宿主的 3'-*glaA* 序列中的原始 *KpnI* 位点可能因双交换重组事件而被破坏(K^*), 但并非一定如此。

图 14: 图示分离自无 *amdS* 选择性标记基因的黑曲霉转化体 ISO-505 的染色体 DNA 用 *KpnI* 或 *BamHI* 消化后用探针 *Hind III/XhoI* 5'-*glaA* DNA 片段(a)或 *SalI/SalI* 3'-*glaA* DNA 片段(b)的杂交模式, 该转化体包括 3 个“*BamHI*, *SalI* 和 *Bgl II* 标记的” Δ *glaA* DNA 扩增子。

图 15: 乙酰胺选择性标记和 *glaA* 打靶载体 pGBAAS-1 的物理图谱。

图 16: 肌醇六磷酸酶表达盒和 *glaA* 打靶载体 pGBTOPFYT-1 的物理图谱。

图 17: 图例说明定向 PCR 检验可测定 *phyA* 表达盒(a)或 *amdS* 盒(b)是否已导入黑曲霉 ISO-505 转化体的一个 3'-3''-*glaA* 靶位点的附近。这些盒中之一的打靶将导致两例均扩增一个 4.2Kb 大小的 DNA 片段。

图 18: 图示黑曲霉 ISO-505 的三个 Δ *glaA* 区。所示杂交模式为 *BglIII* 消化物用 2.2Kb *SalI/XhoI* 3''-*glaA* DNA 片段作探针杂交的。

图 19: 图示 pGBAAS-1/pGBTOPFYT-1 黑曲霉 ISO-505 转化体中的 Δ *glaA* 区(分别标记为 B^* , Sa^* 和 Ba^*), 其中多个 *amdS* 盒打靶到黑曲霉 ISO-505 宿主的三个 Δ *glaA* 区之一。所示杂交模式为 *BglIII* 消化物

用探针 2.2Kb SalI/XhoI 3"-glaA DNA 片段杂交的。值得注意的是, 7.5Kb BglIII 杂交片段的存在和强度取决于所整合的 amdS 盒数(n)。

图 20: 图示 pGBAAS-1/pGBTOPFYT-1 黑曲霉 ISO-505 转化体的三个 Δ glaA 区(分别标记为 B*, Sa*和 Ba*), 其中多个 phyA 已整合在黑曲霉 ISO-505 宿主三个 Δ glaA 区之一的 3'-3"-glaA 靶序列邻近位点, 同时还有下游的一个或多个 amdS 盒, 所示杂交模式为 BglIII 消化物用探针 2.2Kb SalI/Xho I 3"-glaA DNA 片段杂交的。值得注意的是, 7.5Kb Bgl III 杂交片段的强度取决于整合的 phyA 和 amdS 盒数(n)。

图 21: 图示 pGBAAS-1/pGBTOPFYT-1 黑曲霉 ISO-505 转化体的三个 Δ glaA 区(分别以 B*, Sa*和 Ba*标记), 其中多个 amdS 盒已整合在黑曲霉 ISO-505 宿主三个 Δ glaA 区之一的 3'-3"-glaA 靶序列附近, 同时还有下游的一个或多个 phyA 盒。所示为 BglIII 消化物用探针 2.2Kb SalI/XhoI 3"-glaA DNA 片段的杂交模式。注意 7.5Kb BglIII 杂交片段的强度取决于所整合的 phyA 和 amdS 盒数(n)。

图 22: 图示 pGBAAS-1/pGBTOPFYT-1 黑曲霉 ISO-505 转化体的三个 Δ glaA 区(分别以 B*, Sa*和 Ba*标记), 其中多个 phyA 盒已整合在黑曲霉 ISO-505 宿主三个 Δ glaA 区之一的 3'-3"-glaA 靶序列附近, 同时还有下游的一个或多个 phyA 和 amdS 盒。所示为 BglIII 消化物用探针 2.2Kb SalI/XhoI 3"-glaA DNA 片段的杂交模式。注意 7.5Kb BglIII 杂交片段的强度取决于所整合的 phyA 和 amdS 盒数目(n)。

图 23: 图示 pGBAAS-1/pGBTOPFYT-1 黑曲霉 ISO-505 转化体的三个 Δ glaA 区(分别以 B*, Sa*和 Ba*标记), 其中多个 amdS 盒已整合在黑曲霉 ISO-505 宿主三个 Δ glaA 区之一的 3'-3"-glaA 靶序列附近, 还有下游的一个或多个 amdS 和 phyA 盒。所示为 BglIII 消化物用探针 2.2Kb SalI/XhoI 3"-glaA DNA 片段的杂交模式。

图 24: 不含 amdS 基因、但含有打靶到“BamHI 标记的” Δ glaA 位点的一个 phyA 拷贝(a), 两个 phyA 拷贝(b)和三个 phyA 拷贝(c)的黑曲霉 ISO-505 转化体物理图谱。图示为 BamHI 和 BglIII 消化物用探

针 3'-glaA 的杂交模式。

图 25: 图示黑曲霉 ISO-505-2 转化体的三个 glaA 区, 其中两个 phyA 盒均打靶到“BamHI 标记的” Δ glaA 扩增子处, 表现为“DNA 旗”基因型 $\text{BamHI}^+/\text{SalI}^+/\text{BglIII}^+$ (A), $\text{BamHI}^{2+}/\text{SalI}^-/\text{BglIII}^+$ (B) 和 $\text{BamHI}^{2+}/\text{SalI}^+/\text{BglIII}^-$ (C)。所示为 BamHI 消化物用探针 2.2kb SalI/XhoI 3'-glaA DNA 片段的杂交型。注意两个 BamHI 杂交片段的强度均取决于不同扩增子的存在和数量。

图 26: 图示黑曲霉 ISO-505-2 转化体的三个 glaA 区, 其中两个 phyA 盒打靶到“BamHI 标记的” Δ glaA 扩增子上, 显示“DNA-旗”基因型 $\text{BamHI}^+/\text{SalI}^+/\text{BglIII}^+$ (A), $\text{BamHI}^{2+}/\text{SalI}^-/\text{BglIII}^+$ (B), $\text{BamHI}^{2+}/\text{SalI}^+/\text{BglIII}^-$ (C)。所示为 BglIII 消化物用探针 1.5Kb Hind III/XhoI 5'-glaA 片段的杂交模式。注意 BglIII 杂交片段的强度取决于不同扩增子的存在和数量。

图 27: 图示黑曲霉 ISO-505-2 转化体的 glaA 区, 其中两个 phyA 盒定位到“BamHI-标记的” Δ glaA 扩增子上, 显示“DNA-旗”基因型 $\text{BamHI}^{3+}/\text{SalI}^-/\text{BglIII}^-$ (A), $\text{BamHI}^{3+}/\text{SalI}^+/\text{BglIII}^-$ (B) 和 $\text{BamHI}^{4+}/\text{SalI}^-/\text{BglIII}^-$ (C)。所示为 BamHI 消化物用探针 1.5Kb Hind III/XhoI 5'-glaA DNA 片段的杂交模式。注意两个 BamHI 杂交片段的强度取决于不同扩增子的存在和数量。

图 28: 图示黑曲霉 ISO-505-2 转化体的 glaA 区, 其中两个 phyA 盒定位到“BamHI-标记的” Δ glaA 扩增子, 具有“DNA-旗”基因型 $\text{BamHI}^{3+}/\text{SalI}^-/\text{BglIII}^-$ (A), $\text{BamHI}^{3+}/\text{SalI}^+/\text{BglIII}^-$ (B) 和 $\text{BamHI}^{4+}/\text{SalI}^-/\text{BglIII}^-$ (C)。所示为 BglIII 消化物用探针 2.2kb SalI/XhoI 3'-glaA DNA 片段的杂交模式。注意两个 BamHI 杂交片段的强度取决于不同扩增子的存在和数量。

图 29: 产黄青霉的 PEN 扩增子。青霉素生物合成基因, HELE 和 HELF 在单个扩增子中的相对位置(括号之间)。多个 PEN 扩增子以直接重复子(n)的形式存在。注意 HELF 的 3' 末端延伸进了邻近的 PEN 扩增子内。

图 30: Southern 分析定量 PEN 扩增子。BstXI 位点的相对位置, 探针及 niaD 位点 (A) 和 PEN 扩增子 (B) 的预期杂交片段的大小。与 HELE 探针杂交的 DNA 量取决于 PEN 扩增子的数量 (n)。

图 31: 经 CHEF 定量 PEN 扩增子。示有 NotI 位点的相对位置及 HELE 探针。NotI 位点位于 PEN 扩增子之外。杂交片段的预计大小取决于 PEN 扩增子的数量, 为 $(30 + nx57)$ Kb。

图 32: 定向整合。(A) 表达载体含目的基因, 该基因受适合的启动子 (P) 和终止子 (T) 调节。该盒的 5' 和 3' 区侧翼与靶位点同源 (用 ' 和 ' 来区分基因组序列和载体序列)。将盒及侧翼克隆进一个大肠杆菌载体中以增殖表达载体。转化之前, 用限制酶 R 消化该表达载体, 产生线性片段并去除大肠杆菌序列。(B) 整合发生在基因组中同源区, 转化片段的游离 5' 和 3' 末端是重组热点。(C) 所得转化体包含 1 个或多个 (n) 的整合在靶位点的转化片段 (括号之间)。

图 33: 表达载体 pHELE-A1。包含侧翼是 HELE 5' 和 3' 区的 amdS 表达盒的转化片段分离成一个 SfiI 片段。这些位点经由用来 PCR 扩增相应侧翼区的寡核苷酸而导入。

图 34: 表达载体 pHELF-A1。包含侧翼是 HELF 5' 和 3' 区的 amdS 表达盒的转化片段分离为一个 SfiI 片段。这些位点经由用来 PCR 相应侧翼区的寡核苷酸导入。

图 35: 表达载体 pHELE-E1。包含侧翼是 HELE 5' 和 3' 区的 cefE 表达盒的转化片段分离为一个 SfiI 片段。

图 36: 表达载体 pHELF-F1。包含侧翼是 HELE 5' 和 3' 区的 cefF 表达盒的转化片段分离为一个 SfiI 片段。

图 37: 重组丢失 amdS。(A) 经表达盒的串联整合产生的 5' 和 3' 侧翼区直接重复子。(B) 5' 和 3' 侧翼配对, 重组通过单交换而发生。(C) 交换位点之间的区段丢失。注意任意数量的盒 (包括目的基因) 均可丢失, 因为所有盒的侧翼均是直接重复子。

图 38: cefE 整合进 HELE。HELE 中单个 cefE 盒的物理图谱 (A) 或多个 cefE 盒的物理图谱。示有 NruI 位点的相对位置, cefE 探针和杂

交片段的预期大小。6.0Kb 片段因盒的多重整合产生，其强度取决于盒存在的数目(n)。

图 39: TAFE 测定的 *cefE* 向 HELE 的整合。示有 *HpaI* 位点的相对位置，探针及杂交片段的预期大小。杂交片段的大小取决于所整合的盒的数量(n) $(5.9+nx6.0)$ Kb。

图 40: 盒及定向 PCR。特异性模板和寡核苷酸结合的图示。定向 PCR 必需的是一个寡核苷酸位于 5' 侧翼的上游。因而，尽管可出现好几个盒，只有在该寡核苷酸 3' 的盒产生 PCR 产物。图中示有有关区段，寡核苷酸和 PCR 产物的预期大小。(A) *cefE* 的盒式 PCR, (B) HELE 内 *cefE* 的定向 PCR, (C) HELE 内 *amdS* 的定向 PCR, (D) *amdS* 的盒式 PCR, (E) *cefE*-*amdS* 结合的定向 PCR, (F) *amdS*-*cefE* 结合的定向 PCR, (G) *amdS*-*amdS* 组合的定向 PCR, (H) *niaD* 位点的盒式 PCR, (I) *cefF* 的盒式 PCR, (J) 整合在 HELF 中的 *cefF* 的定向 PCR, (K) 整合进 HELF 的 *amdS* 的定向 PCR。

图 41: *amdS* 向 HELE 的整合。示有 *HpaI* 位点的相对位置，*amdS* 探针和杂交片段的预期大小。

图 42: 探针。分离的 DNA 片段用于探针制备: (A) *cefE* 探针: pHEL-E1 的 *NdeI*-*NsiI* 片段。(B) *cefF* 探针: pHEL-F1 的 *NdeI*-*NsiI* 片段。(C) *amdS* 探针: pHELE-A1 的 *NotI* 片段。(D) HELE 探针: pHELE-A1 的 *SphI*-*NotI* 片段。(E) *niaD* 探针: 以产黄青霉染色体 DNA 为模板，寡核苷酸 28 和 29 的 PCR 产物。

图 43: 基因转换。通过以另一个 PEN 扩增子中的 *cefE* 替代 *amdS* 而进行的 *cefE* 基因转换和因此所致的重复。

图 44: 在一个扩增子中的 (*cefE*+*cefF*) 整合。示有 *NotI* 位点的相对位置，HELE 探针和 *cefE* 和 *cefF* 向同一个扩增子上的 HELE 和 HELF 中整合的特异杂交片段的预期大小。注意 *NotI* 位点是通过 *cefE* 和 *cefF* 盒的整合而掺入的。

图 45: *cefF* 向 HELF 的整合。HELF 中的单个 *cefF* 盒的物理图谱 (A) 或多个 *cefF* 盒的物理图谱 (B)。示有 *NruI* 位点的相对位置，*cefF*

探针和杂交片段的预期大小。5.7Kb 片段是盒多次整合的结果，它的强度取决于盒的存在数量(n)。

图 46: (cefE+cefF)基因转版本中的 cefE 定量。示意 NruI 位点的相对位置，探针及针对 HELE 中 (A) 单个或 (B) 多个 cefE 盒的杂交片段的预期大小。此 6.0Kb 片段是盒多次整合的结果，其强度取决于盒的数量(n)。(C)niaD 位点。基因转版本将具有相同于亲代株的杂交模式，但强度相对于 niaD 信号更强。

图 47: (cefE+cefF)基因转版本中的 cefF 定量。NruI 位点的相对位置，探针及针对 HELF 中 (A) 单个或 (B) 多个 cefF 盒的杂交片段的预期大小。此 5.7Kb 片段是盒多次整合的结果，其强度取决于盒的数量(n)。(C)niaD 位点。基因转版本将具有相同于亲代株的杂交模式，但强度相对于 niaD 信号更强。

图 48: cefE 基因转版本的定量。NruI 位点的相对位置，探针和针对 HELE 中 (A) 单个或 (B) 多个 cefE 盒的杂交片段的预期大小。此 6.0Kb 片段是盒多次整合的结果，其强度取决于盒的数量(n)。(C)niaD 位点。基因转版本将具有相同于亲代株的杂交模式，但强度相对于 niaD 信号更强。

发明详述

本发明的第一方面涉及其基因组中至少两个基本同源的 DNA 区内整合有一种重组 DNA 分子的丝状真菌，其中这些 DNA 区不是核糖体 DNA 重复序列。本发明的丝状真菌制备方法是：用一种重组 DNA 分子转化其基因组中至少有两个这样的 DNA 区的丝状真菌，并鉴定至少一个重组 DNA 分子整合进了至少一个这样的 DNA 区的转化体，随后鉴定转化体的子代中，含有该重组 DNA 分子的 DNA 区已通过与 DNA 区的其它形式进行基因转变或通过含该重组 DNA 分子的 DNA 区的扩增而增加了的菌株。或者说，本发明的丝状真菌在其基因组中至少一个内源 DNA 区内掺入了至少一个重组 DNA 分子。

本发明的丝状真菌是真核微生物，包括真菌界真菌门的所有丝状

形式(参见如, Lasure 和 Bennett, 1985, 真菌分类学, 在“真菌的基因操作”一书中, pp531-535, Academic Press 公司)。本发明的丝状真菌从形态学, 生理学和遗传学上区别于酵母: 比较于酵母菌如酿酒酵母, 丝状真菌的营养生长是通过菌丝体延伸进行, 碳的代谢是专性需氧的。而且, 酵母菌如酿酒酵母有明显的稳定二倍体期, 而丝状真菌如构巢曲霉和粗糙脉孢菌的二倍体只是在减数分裂之前短期存在。此外, 很多工业上重要的丝状真菌属于半知菌(Deuteromycotina)亚门, 亦称半知菌, 是一类人为划分的缺乏任何已知有性形式的真菌。本发明的优选丝状真菌属于曲霉属, 木霉属, 青霉属, 头孢霉属, 枝顶孢属, 镰孢霉属, 毛霉属, 根霉属(*Rhizopus*), *Phanerochaete*, 脉孢菌属, 腐质霉属, 麦角属, 粪壳属, 黑粉菌属, 裂褶菌属, 布拉霉属, 被孢霉属, 须霉属, 弯颈霉属(*Tolypocladium*)各属。本发明的最优选丝状真菌是属于由 Raper 和 Fennell 所确定的黑曲霉(1965, “曲霉属”一书中, Williams & Wilkin 公司, Baltimore)的真菌, 如黑曲霉; 由 Raper 和 Fennell 所确定的黄曲霉类(文献同上), 如米曲霉; 以及真菌 *Trichoderma reesei* 和产黄青霉。本发明以黑曲霉和产黄青霉示范。

本发明的丝状真菌在其基因组中包含至少两个适于整合一或多拷贝重组 DNA 分子的基本同源的 DNA 区, 其中该 DNA 区不是核糖体 DNA。本文实施例中, 黑曲霉中扩增的葡糖淀粉酶(*glaA*)位点和产黄青霉中扩增的青霉素簇均用作整合重组 DNA 分子的 DNA 区。黑曲霉的 *glaA* 位点和产黄青霉的青霉素簇(含青霉素生物合成基因 *pcbAB*, *pcbC* 和 *penDE*)在野生型黑曲霉和产黄青霉菌株的基因组中均以单拷贝出现。含多拷贝的这些 DNA 区的菌株, 如本实施例所用的, 可在经典的菌株改良程序中分别通过选择葡糖淀粉酶或青霉素产量增加了的菌株而获得。通常, 这些产量的增加是所选菌株中 DNA 区扩增的结果。这些扩增的 DNA 区在后文中称扩增子。虽然本发明优选这些扩增子作为整合重组 DNA 分子的 DNA 区, 但并非仅限于此。事实上, 在丝状真菌基因组中有两个或更多基本同源形式的任何 DNA 区均可应用, 只要它们

满足以下两项功能标准: 1) 该 DNA 区应适于接受重组 DNA 分子的整合; 2) 该 DNA 区应能与真菌基因组中其它基本同源区发生重组, 以使整合了的重组 DNA 分子通过基因转变而增加。

为符合第一个标准, DNA 区应有足够的长度以便重组 DNA 分子可通过同源重组打靶到该区内。为此, DNA 区应包含至少 100bp, 优选至少 1kb, 更优选至少 2Kb。确定 DNA 区是否适合于整合重组 DNA 分子还可看是否向该 DNA 区的整合符合不破坏所研究的丝状真菌有活力所必需的功能的要求。

第二个功能标准, 即能与真菌基因组中该区的其它基本同源版本重组, 这是为了允许在该 DNA 的不同版本间进行基因转变。达到这一目的的最低要求是每个版本区任一侧的 DNA 序列与其它版本 DNA 区的相应侧序列相互有足够同源性, 以便在侧序列之间进行同源重组。这种同源重组的结果是发生基因转变, 其中该 DNA 区的一个版本被含整合重组 DNA 分子的其它 DNA 区的复制体取代。允许基因转变的侧翼序列最小长度和最小同源范围尚不确定, 可能因所研究的生物不同而有变化。可能最小长度为 100bp 且总同源性不少于 60% 能允许基因转变。显然, 基因转变频率将随该 DNA 区侧序列的长度和同源性的增加而增加。优选不同区的侧序列有至少 1Kb, 其同源性至少 80%。真菌基因组可能包含一类或不同类型的上述 DNA 区。不同类型的并非互为完全拷贝的这些区的实例有等位基因变异体, 编码同工酶的基因家族和/或基因。最优选的区为互为确切拷贝的区, 区别至多在于所整合重组 DNA 分子。这些相同区的实例是扩增子。故在本发明的一个优选实施方案中, 上述适于整合一或多拷贝重组 DNA 分子的 DNA 区为扩增子。

DNA 区的总长度并不十分重要, 可在 1Kb 以下至几百 Kb 的范围内变化, 如本文实施例中 DNA 区的长度从扩增的青霉素簇每单位约 57Kb 至扩增的 *glaA* 位点每单位超过 80Kb 的范围内。

重组 DNA 分子包含向本发明的丝状真菌导入所需遗传修饰所要求的遗传因子的任意组合。重组 DNA 分子包含任何遗传因子, 其部分或其组合, 如基因(编码部分或完整位点), cDNA, 启动子, 终止子, 内

含子，信号序列，DNA 结合蛋白的任何调节序列或识别序列。遗传因子还可包含已被修饰，即有一个或更多核苷酸改变(如插入，缺失，替代)的 DNA 序列。

所需遗传修饰包括任何修饰，即在所选丝状真菌中有 DNA 序列的插入、缺失、和/或取代，这是因一个或更多个上述遗传因子通过转化或与重组 DNA 分子共转化而导入真菌的结果。可理解的是，这些遗传修饰可在互不相干的多轮转化中被导入。

根据本发明的一个实施方案，整合进丝状真菌 DNA 区中的重组 DNA 分子包含一个或多个表达盒以表达一个或多个目的基因。本文中表达盒意指包含将被表达的目的基因并可操作连接于能影响并调节该基因表达的适当表达因子的 DNA 片段。这样的表达因子包括启动子，信号序列，终止子等。

如果丝状真菌意图用于生产蛋白质或酶(不管异源还是同源)，目的基因优选编码分泌型蛋白或酶，故应包含可引起酶分泌的信号序列。此实施方案用含黑曲霉肌醇六磷酸酶基因的表达式向黑曲霉 glaA 扩增子内的整合举例说明。然而，技术人员应十分清楚本发明可应用于任何感兴趣的蛋白质或酶。

或者，如果丝状真菌意图用于生产初级或次级代谢产物，则目的基因通常编码一种或多种涉及这些代谢物的生物合成的胞内酶。根据本发明的一个优选实施方案，丝状真菌包含一个或多个整合在 DNA 区中的重组 DNA 分子，而这些重组 DNA 分子包含一个或多个胞内酶的表达盒，这些酶是丝状真菌天然不具有的代谢途径中的成员。这些丝状真菌的实例包括如在其青霉素扩增子中整合有脱乙酰氧基头孢菌素(deacetoxycephalosporin)C 合成酶(扩展酶(expandase))和脱乙酰基头孢菌素(deacetylcephalosporin)C 合成酶(羟化酶)的表达盒、能分别允许菌株合成己二酰-7-氨基脱乙酰氧基头孢菌酸(adipoyl-7-aminodeacetoxycephalosporanic acid)和己二酰氨基脱乙酰基头孢菌酸(adipoyl aminodeacetylcephalosporanic acid)的产黄青霉菌菌株。

重组 DNA 分子整合进 DNA 区的机制对本发明并不重要，可取决于本发明应用者的实际工作。重组 DNA 分子整合进 DNA 区可通过随机整合，但更优选同源重组性整合，不管是单交换重组事件的整合(即导致插入该重组 DNA 分子)，还是双交换重组整合(即导致被重组 DNA 分子取代 DNA 区原有序列的一部分)。为促进经同源重组发生整合，重组 DNA 优选包含与靶序列同源以整合进 DNA 区的序列。这些重组 DNA 分子中的打靶序列优选相同于 DNA 区中的靶序列。

在本发明的较优选实施方案中，丝状真菌中存在的基本同源 DNA 区的每个版本包含一个整合拷贝的重组 DNA 分子。真菌中所有 DNA 区全部被整合重组 DNA 分子占据，这样可产生最大可能拷贝数的重组 DNA 分子，并提供更稳定状态，因为这样的真菌不含能作为与充实 DNA 区进行基因转变的供体的“空”DNA 区，从而不会减少整合重组 DNA 分子的拷贝数。可以是同类型的 DNA 区每个版本被重组 DNA 分子占据，也可以是不同型的上述 DNA 区每个版本被占。优选丝状真菌基因组中基本同源 DNA 区的所有类型的每个版本均包含一个整合拷贝的重组 DNA 分子。

本发明的一个有利方面中，用于整合重组 DNA 分子的 DNA 区在其天然状态下包含能高水平表达的内源基因。一般已知整合的重组基因的表达水平可根据其在基因组中的整合位点不同而差异很大。用高表达区整合需表达的重组基因好处是这些区至少能支持内源基因的高水平表达。故似乎这些区也将支持整合的重组基因高水平表达。事实上我们发现，如本文实施例所述，向黑曲霉的 *glaA* 区整合和向产黄青霉的青霉素簇整合比向一些其它基因位点的整合会提供每基因拷贝的更高水平表达。在此可理解的是，能高水平表达的基因规定为最高水平表达时产生的 mRNA 至少占总 mRNA 群体的 0.1%，优选至少占总 mRNA 的 0.5%，更优选至少占总 mRNA 的 1% 的基因。这些可高度表达的内源基因(其所在区特别适于整合本发明的重组 DNA 分子)的实例有糖酵解

酶基因，淀粉酶基因，纤维素分解酶基因和/或抗生素生物合成酶基因。更优选是包含涉及工业化生产过程、并已知高水平表达的基因如葡糖淀粉酶基因、TAKA 淀粉酶基因、纤维二糖水解酶基因和青霉素生物合成基因的区。

本发明的一方面中，丝状真菌中每拷贝的 DNA 区内可高表达的内源基因当其表达非必需时可以被失活。此时，高表达内源基因的失活节约了能量和资源，可进一步表达目的基因。而且，若经重组 DNA 分子的整合产生的目的酶和内源基因编码的酶均为分泌型酶，则内源酶的失活将导致目的酶的制剂更纯。内源基因失活方法优选不可逆缺失内源基因的至少一部分，以便排除失活的回复突变。内源基因的失活更优选不可逆缺失启动子及上游激活序列的至少一部分。当经重组 DNA 的整合而生产的酶的编码基因表达受到该内源基因的启动子驱动时，这将特别有利，因为这将使可能限制目的基因表达所需转录因子的竞争作用减少。

本发明的另一实施方案中，丝状真菌中 DNA 区的每个版本通过独有的序列标记区别于其他版本。这些序列标记能用来监控不同区之间的基因转变，这将便于筛选和/或选择带所需基因型的转版本。任何形式的序列标记均可应用，只要它们允许检测 DNA 区的不同版本：如从可在 Southern 印迹中检测的限制位点到提供易于分析的表型的完整可选择标记基因。本文的一个特别有效实施方案举例说明了序列标记，允许在单 PCR 中用一对寡核苷酸作引物引发 PCR 以检测每个区。各区如此修饰以致于 PCR 中每个版本产生的 PCR 片段有各自独有的长度。所获 PCR 片段的长度和强度分别显示各区的存在和拷贝数。这种序列标记形式，称为“DNA 旗”(DNA flag)，可用来快速分析大量转化体集落的基因型，以便获得带所需基因型的转化体。

本发明进一步涉及制备本发明之丝状真菌的方法。这些方法包括用重组 DNA 分子转化这样的丝状真菌：其中一条或多条染色体包含至

少两个基本同源的、适于一或多拷贝的重组 DNA 分子整合的 DNA 区，而且这些 DNA 区不是核糖体 DNA 重复序列。丝状真菌的转化现对于技术人员已常规化，现已有各种适用于丝状真菌的转化方案。

用重组 DNA 分子转化丝状真菌要求应用能区别吸收了转化 DNA 形式的真菌细胞与未转化细胞的可选择标记基因。多种可选择标记基因可用于丝状真菌的转化。适合的标记包括涉及氨基酸或核苷酸代谢的营养缺陷型标记基因，如编码鸟氨酸转氨甲酰酶(argB)，乳清苷-5'-脱羧酶(pyrG)，或谷氨酰胺酰胺转移酶，吲哚甘油磷酸合成酶，磷酸核糖基邻氨基苯甲酸异构酶(trpC)的基因，或涉及碳元素或氮代谢的营养缺陷型标记基因，如 niaD 或 facA，以及抗生素抗性标记，如腐草霉素抗性基因，博来霉素抗性基因或新霉素(G418)抗性基因。优选应用双向选择标记，即既有阳性遗传选择又有阴性遗传选择。这些双向选择标记的实施有 pyrG, facA, 和 amdS 基因。由于其双向选择性，这些标记可从转化的丝状真菌中缺失，只剩下导入的重组 DNA 分子在其位点上，从而可获得不含选择标记的丝状真菌。此 MARKER GENE FREE™ 转化技术的要素公布于 EP-A-0 635 574，被本文引为文献。这些选择标记中，应用显性的双向选择标记如象构巢曲霉，黑曲霉和产黄青霉的 amdS 这样的乙酰胺酶基因为最优选。除了其双向性，这些标记还提供这样的优点，即作为显性选择标记，应用时无需突变型(营养缺陷型)菌株，可直接应用于野生型菌株。

因而另一个实施方案涉及本发明的丝状真菌，其中重组 DNA 分子缺乏选择标记基因，或更优选本发明的丝状真菌总共缺乏一个选择标记基因。

用重组 DNA 分子转化本发明的丝状真菌时，所用选择标记既可物理连接于被转化的重组 DNA 分子上，也可位于与所需重组 DNA 分子共转化的另一个 DNA 分子上。共转化经常被本领域技术人员采用，因为在丝状真菌中其发生频率相对较高。

制备本发明之丝状真菌方法的下一步包括选择有至少一个重组 DNA 分子整合进丝状真菌的至少一个 DNA 区的转化体。技术人员可采

用多种常规技术检测所获转化体哪一个在其一个 DNA 区中整合了一个重组 DNA 分子。下一步对选择的转化体进行增殖，从其子代中选出其中至少两个 DNA 区包含整合重组 DNA 分子的菌株。这意味着所选择的是其中包含整合重组 DNA 分子的 DNA 区经与“空”DNA 区基因转变或经扩增而增加了的菌株。这种基因转变和/或扩增事件以低频率自发发生。其确切频率取决于包括所研究真菌，DNA 区的数量、长度和同源程度在内的多个变量。然而我们发现，这些频率之高足以使我们能用当今的分析技术筛选和选择发生了这些事件的菌株。其内包含整合重组 DNA 分子的 DNA 区数量已增加的菌株可通过例如简单地筛选出合成受重组 DNA 分子影响的产物以较高水平生产的菌株而鉴定，或者通过用例如上文简述的“DNA 旗”检验分析其基因型而鉴定。

本发明的方法可包含附加的步骤，即对其中含整合重组 DNA 分子的 DNA 区有增加的菌株进行增殖，从其后代菌株中筛选到 DNA 区的其它拷贝含整合重组 DNA 分子的菌株。可将这些菌株再执行一次此程序，直至获得其中每个 DNA 区均包含整合重组 DNA 分子的菌株。如本文所概述，这些菌株优点在于重组 DNA 分子拷贝数高且稳定性增加。

用于制备本发明丝状真菌的方法的另一方面中，重组 DNA 分子包含基本同源于 DNA 区的序列。这些基本同源序列在重组 DNA 分子中的存在将明显增加重组 DNA 分子整合进 DNA 区的频率，重组 DNA 分子中基本同源序列的最小需求尚不清楚，但实际工作中，用至少 1Kb，优选至少 2Kb 的同源定向序列获得了合理的定向频率。

如上所述，本发明的一个方面涉及应用双向选择标记，以使用重组 DNA 分子转化丝状真菌。一旦获得这样一个转化体，便可对其进行负选择，筛选双向选择标记的缺失。这些缺标记转化体可再进一步转化，或可增殖，以从子代菌株中选择含重组 DNA 分子的 DNA 区有基因转变和/或扩增的菌株。

在制备本发明之丝状真菌的另一方法中，丝状真菌用重组 DNA 分子转化，选择有至少一个重组 DNA 分子整合进预定基因组靶序列的转

化体。该转化体随后经增殖，从其子代选出有至少两个 DNA 区包含整合重组 DNA 分子的菌株。此例中待用重组 DNA 分子转化的受体丝状真菌无需包含多拷贝的 DNA 区。DNA 区最好是在重组 DNA 分子整合后扩增。

本发明能够用于制备这样的重组丝状真菌：在其一条或多条染色体中包含至少两个适于整合一或多拷贝重组 DNA 分子的基本同源 DNA 区，其中这些 DNA 区并不是核糖体 DNA 重复序列，又其中至少两个 DNA 区包含一个整合拷贝的重组 DNA 分子。这些重组真菌可应用于生产感兴趣产品的工艺中。该工艺通常包括在有助于生产感兴趣产品的培养基中培养重组细胞，从培养基和/或从真菌中回收感兴趣的产品。这些产品可以是蛋白质，如酶，和/或初级代谢产物，如 CO₂，乙醇或有机酸，和/或次级代谢产物，如抗生素或类胡萝卜素。感兴趣产物也可是重组真菌自身，即生产中所获生物物质。本发明丝状真菌中可产生的酶和蛋白质实例有脂肪酶，磷脂酶，磷酸酶，肌醇六磷酸酶，蛋白酶，支链淀粉酶，酯酶，糖苷酶，淀粉酶，葡糖淀粉酶，过氧化氢酶，葡糖氧化酶，β-葡糖苷酶，阿拉伯呋喃糖苷酶，鼠李糖苷酶，芹菜糖苷酶，凝乳酶，乳铁蛋白，细胞壁降解酶如纤维素酶，半纤维素酶，木聚糖酶，甘露聚糖酶，果胶酶，鼠李半乳糖醛酸酶等等。

本发明的丝状真菌的一些优点及其制备方法概述如下：

- 相比较于已有的向丝状真菌非随机性多拷贝整合重组 DNA 分子的系统，本发明提供更广泛用途。更广泛用途是因为本发明不限于应用缺陷选择标记基因进行转化。还因为本发明不限于只应用核糖体 DNA 序列作为整合的靶序列。
- 与传统的重组丝状真菌(其中重组 DNA 分子以串联排列方式随机整合)相比，本发明的丝状真菌其整合的多拷贝重组 DNA 分子具有更强的遗传稳定性。具体地说，有高拷贝数的随机整合重组 DNA 分子的丝状真菌通常是大量串联重复的重组 DNA 分子只整合于极少

数基因组位点。该构型在遗传上不如本发明的构型稳定，在本发明的构型中，只有极少数串联重复拷贝的重组 DNA 分子(优选不超过 5 个拷贝)整合在好几个不同基因组位点，如基本同源的 DNA 区。例如，本发明的丝状真菌可能有的拷贝数为 15，其中在 5 个基本同源 DNA 区中每个区整合有 3 个串联重复的重组 DNA 分子拷贝。相比之下，有 15 个拷贝的传统重组丝状真菌可能有 10 个拷贝整合在一个不确定的基因组位点，而另 5 个拷贝在另一个不确定的基因组位点。按照本发明，我们发现，就重组 DNA 分子的丢失而言，后一种构型比本发明有相同拷贝数的真菌稳定性要差得多。

- 与整合发生在核糖体 DNA 的丝状真菌相比，本发明的丝状真菌预期相对于每个基因拷贝的表达水平更高，因为前者尚未进化得可支持蛋白编码基因的高水平 RNA 多聚酶 II 转录过程。
- 本发明的丝状真菌均为多拷贝菌株，至少能够完全确定就整合重组 DNA 分子而言的基因型。这将有利于获得对这些真菌所涉及工艺和产物的核准。
- 基于相似的理由，对丝状真菌表型的预计将比传统型重组 DNA 分子在其中随机整合的重组丝状真菌容易得多，因为随机整合能改变整合位点之中或附近的未知基因的表达。
- 制备本发明之丝状真菌的方法具有可与较早的经典菌株改良程序协同的好处。如上简述，在本发明的优选实施方案中，用到了从经典菌株改良程序中获得的工业化丝状真菌。应用这些真菌的好处不仅是因为它们常包含适于整合并随后扩增本发明之重组 DNA 分子的扩增子，而且还因为工业化丝状真菌带有累积的(大量)突变，它们不仅对菌株改良程序所针对的产品(“前期”产品)的生产有好处，而且对其它新产品的生产有好处。通过对这些改良后的工业化丝状真菌中涉及“前期”产品生产的基因进行修饰以便使真菌产生新产品，这些有利突变将对新产品的生产有好处。这样一来，本发明可在开发新生产菌株时更省事。

- 本发明能够“设计和建造”出重组丝状真菌。“设计和建造”指，在单拷贝水平上，设计由所有将被导入 DNA 区中的所需遗传修饰组成。例如，假如要生产所需蛋白质，则将该蛋白质的一个或多个表达盒整合进 DNA 区，并使位于同一 DNA 区、可能对所需蛋白质的表达有负影响的内源基因失活。假如要生产混合蛋白质，设计过程将包括调节不同蛋白质的表达水平至所需比率。在要以预定比率导入一系列新代谢活性、构成新代谢途径的一部分的代谢途径改造中，后一种情况可能尤其有利。一旦在单拷贝水平上于这些 DNA 区中建立了所需遗传修饰的设计，建造过程将可启动，这意味着通过对含所需遗传修饰的区进行基因转变和/或扩增而增加所设计的单拷贝区，直至达到所需生产水平为止。

实施例

命名

A. niger 黑曲霉

P. Chrysogenum 产黄青霉

S. clavuligerus 带小棒链霉菌

A. nidulans 构巢曲霉

phyA 黑曲霉 phyA 基因，编码肌醇六磷酸酶。

amdS 构巢曲霉 amdS 基因，编码乙酰胺酶 (Corrick 等, 1987, 基因, 53:63-71)

cefE 带小棒链霉菌 cefE 基因，编码脱乙酰氧基头孢霉素 C 合成酶 (Kovacevic 等, 1989, 细菌学杂志, 171:754-760)

cefF 带小棒链霉菌 cefF 基因，编码脱乙酰基头孢霉素 C 合成酶 (Kovacevic, S. 和 Miller, J. R. 1991 细菌学杂志, 173: 398-400)

niaD 产黄青霉 niaD 基因，编码硝酸盐还原酶 (Haas 等, 1996, 生物化学、生物物理学学报 (Biochem. Biophys. Acta) 1309:81;-84)

- glaA 黑曲霉 glaA 基因, 编码葡糖淀粉酶
- gpdA 构巢曲霉 gpdA 基因, 编码甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (Punt 等, 1988 基因 69:49-57)
- pcbC 产黄青霉 pcbC 基因, 编码异青霉素 N 合成酶 (IPNS) (Carr 等, 1986 基因 48:257-266)
- P_{gpdA} gpdA 启动子
- P_{glaA} glaA 启动子
- P_{pcbC} pcbC 启动子
- P_{enDE} penDE 终止子
- T_{amdS} amdS 终止子
- T_{glaA} glaA 终止子
- GLA 黑曲霉葡糖淀粉酶蛋白质

缩写

- CHEF 钳位均匀电场(电泳)
- TAFE 横向交变电场电泳
- Kb 千碱基
- bp 碱基对
- ADCA 氨基脱乙酰氧基头孢菌酸
- ADAC 氨基脱乙酰基头孢菌酸
- oligo 寡核苷酸
- PCR 聚合酶链式反应

寡核苷酸

1. 5'-gta gct gcg gcc gcc tcc gtc ttc act tct tcg ccc gca ct-3'
2. 5'-caa agg gca tgc ggc cgt atc ggc cgg tga caa aca tca ttc aac gcc-3'
3. 5'-atg ttt aag ctt ggc cga tac ggc caa aac acc ttt gat ttc-3'

4. 5'-caa gtt gcg gcc gct cct cac taa cga gcc agc aga tat
cga tgg-3'
5. 5'-aag ctt atg cgg ccg cga att cga gct ctg tac agt gac-
3'
6. 5'-cgg tac gtg cgg ccg ctc gta cca tgg gtt gag tgg tat
g-3'
7. 5'-ata tgt gcg gcc gct tta cat ggt caa tgc aat tag atg
gtg g-3'
8. 5'- ata act cta gag gcc cta ccg gcc ttt gca aat ata ctg
taa gaa cc-3'
9. 5'-gta tat tct gca ggg ccg gta ggg cca aca gtt tcc gca
ggg g-3'
10. 5'-gta tgg gcg gcc gct tta caa cta gaa tat ggg aac ctg
tgg g-3'
11. 5'-ctc gag tgc ggc cgc aaa gct agc ttg ata tcg aat tcc
tta tac tgg gcc tgc tgc att g-3'
12. 5'-gtc cat atg ggt gtc tag aaa aat aat ggt gaa aac ttg
aag gcg-3'
13. 5'-cat atg gcg gac acg ccc gta ccg atc ttc-3'
14. 5'-atg cat tgg ctc gtc atg aag agc cta tca tcc ggc ctg
cgg ctc gtt ctt cgc-3'
15. 5'-cag cta ccc cgc ttg agc aga cat c-3'
16. 5'-gtc agg gaa gaa cac gag ggc gca g-3'
17. 5'-ccc tct ctt cgt cgt tgt cca cgc c-3'
18. 5'-atg tcc ttg gcc gac ttc agc tcg g-3'
19. 5'-gac gag cca atg cat ctt ttg tat g-3'
20. 5'-cgg gta ctc gct cta cct act tcg g-3'
21. 5'-gcc cag tat aag gaa ttc gat atc aag-3'
22. 5'-agg gtc gac act agt tct aga gcg g-3'
23. 5'-gac gtt atc gga cgg aga ctc agt g-3'
24. 5'-gcc tac tct gtt ctg gag agc tgc-3'
25. 5'-ccc cca tcc cgg tca cgc act cgc g-3'
26. 5'-cac aga gaa tgt gcc gtt tct ttg g-3'
27. 5'-tca cat atc ccc tac tcc cga gcc g-3'
28. 5'-gtc gcg tat ccc agg-3'
29. 5'-gtc aaa gga tat gca tac-3'

30. 5'-agc tta tgc ggc cgc gaa ttc agg tac cgt atc tcg aga-3'
31. 5'-aat ttc tcg aga tac ggt acc tga att cgc ggc cgc ata-3'
32. 5'-gtg cga ggt acc aca atc aat cca ttt cgc-3'
33. 5'-atg gtt caa gaa ctc ggt agc ctt ttc ctt gat tct-3'
34. 5'-aga atc aag gaa aag gct acc gag ttc ttg aac cat-3'
35. 5'-atc aat cag aag ctt tct ctc gag acg ggc atc gga gtc ccg-3'
36. 5'-gac cat gat tac gcc aag ctt-3'
37. 5'-gga tcc tta act agt taa gtg ggg gcc tgc gca aag-3'
38. 5'-tta act agt taa gga tcc aca atc aat cca ttt cgc-3'
39. 5'-gct cta gag cgg ccg cga att cat ccg gag atc c-3'
40. 5'-ctt tgc gca ggc ccc cac-3'
41. 5'-tgc agg gta aat cag gga-3'
42. 5'-tcc gct aaa ggt ggt cgc g-3'
43. 5'-ccc cag cat cat tac acc tc-3'
44. 5'-aaa gga ccc gag atc cgt ac-3'
45. 5'-tct cga tac caa ggt cac cac ggg c-3'
46. 5'-gca tcc atc ggc cac cgt cat tgg a-3'
47. 5'-atc cag acc agc aca ggc agc ttc g-3'
48. 5'-tcc gca tgc cag aaa gag tca ccg g-3'
49. 5'-gtc gac tta act agt taa ggc ttc aga cgc agc gag-3'
50. 5'-tta act agt taa gtc gac aca atc aat cca ttt cgc-3'
51. 5'-aga tct tta act agt taa gtg gcc tga aca gtg ccg-3'
52. 5'-tta act agt taa aga tct aca atc aat cca ttt cgc-3'

材料与amp;方法

总过程

标准分子克隆技术，如 DNA 的分离，凝胶电泳，核酸的酶切消化修饰，Southern 分析，大肠杆菌转化等，均按 Sambrook 等(1989)“分子克隆：实验室手册”，冷泉港实验室，冷泉港，纽约，和 Innis 等(1990)“PCR 程序，方法及应用指南”Academic Press，圣迭哥所述进行。合成寡脱氧核苷酸得自 ISOGEN Bioscience(Maarssen，荷兰)。

DNA 序列分析在 Applied Biosystems 373A DNA 测序仪上按厂家建议执行。

黑曲霉的转化

黑曲霉的转化按 Tiburn, J. 等 (1983) 基因 26, 205-221 和 Kelly, J. & Hynes, M. (1985) EMBO J., 4, 475-479 所述方法进行, 其中有以下修改:

将孢子接种于曲霉基本培养基中, 在转速为 300rpm 的旋转摇床中 30℃ 生长 16 小时。曲霉基本培养基每升中含有: 6g NaNO₃; 0.52g KCl; 1.52g KH₂PO₄; 1.12ml 4M KOH; 0.52g MgSO₄ · 7H₂O; 10g 葡萄糖; 1g 酪蛋白水解物, 22mg ZnSO₄ · 7H₂O; 11mg H₃BO₃; 5mg FeSO₄ · 7H₂O; 1.7mg CoCl₂ · 6H₂O; 1.6mg CuSO₄ · 5H₂O; 5mg MnCl₂ · 2H₂O; 1.5mg Na₂MoO₄ · 2H₂O; 50mg EDTA; 2mg 核黄素; 2mg 盐酸硫胺素; 2mg 烟酰胺; 1mg 盐酸吡哆醇; 0.2mg 泛酸; 4 μg 生物素; 10ml 青霉素 (5000IU/ml) 链霉素 (5000UG/ml) 溶液 (Gibco)。

- Novozym 234 (Novo Industries) 取代解旋酶用于制备原生质体;
- 原生质体形成 (60-90 分钟) 后, 加入 KC 缓冲液 (0.8M KCl, 9.5mM 柠檬酸, pH6.2) 至终体积为 45ml, 原生质体悬浮液用悬桶式转头于 4℃ 在 3000rpm 离心 10 分钟, 再将原生质体重新悬浮于 20ml KC 缓冲液, 然后加入 25ml STC 缓冲液 (1.2M 山梨糖醇, 10mM Tris-HCl pH7.5, 50mM CaCl₂)。该原生质体悬浮液在悬桶式转头上于 4℃ 在 3000rpm 离心 10 分钟, 在 STC 缓冲液中洗涤并重新悬浮于 STC 缓冲液中, 浓度为 10⁸ 个原生质体/ml;
- 向 200 μl 原生质体悬浮液中加入溶于 10 μl TE 缓冲液 (10mM Tris-HCl pH7.5, 0.1mM EDTA) 的 DNA 片段, 及 100 μl PEG 溶液 (20% PEG4000 (Merck), 0.8M 山梨糖醇, 10mM Tris-HCl pH7.5, 50mM CaCl₂);
- 将 DNA-原生质体悬浮液室温温育 10 分钟后, 缓缓加入 1.5ml PEG 溶液 (60% PEG4000 (Merck), 10mM Tris-HCl pH7.5, 50mM CaCl₂)

并反复混合试管。室温温育 20 分钟后，将悬浮液用 5ml 1.2M 山梨糖醇稀释，颠倒混合，室温 4000rpm 离心 10 分钟。原生质体重新轻柔地悬浮于 1ml 1.2M 山梨糖醇中，铺板于选择性再生培养基，该培养基由不含核黄素、盐酸硫胺素，烟酰胺、吡哆醇、泛酸、生物素、酪蛋白水解物和葡萄糖的曲霉基本培养基组成，并补加有 10mM 乙酰胺作为唯一氮源，1M 蔗糖，并以 2% 细菌学 1#琼脂 (Oxoid, England) 固定成形。30° 温育 6-10 天后，将这些平板影印至选择性乙酰胺平板 (曲霉基本培养基其中 2%葡萄糖取代蔗糖，1.5%琼脂糖取代琼脂) 上。30℃ 生长 5-10 天后分离出单个转化体。

产黄青霉的转化

用 Ca-PEG 介导的原生质体转化程序。原生质体的制备和产黄青霉的转化按 Gouka 等，生物技术杂志 20 (1991)，189-200 所述方法进行，其中有以下修改：

-转化后，将原生质体铺板于选择性再生培养基平板上，该培养基组成为曲霉基本培养基，以 1.2M 蔗糖渗透稳定，含 0.1% 乙酰胺为唯一碳源，以 1.5% 细菌学 1#琼脂 (Oxoid, England) 固定成形。

-25℃ 温育 5-8 天后转化体出现。

TAFE

大小在 20-50Kb 范围的 DNA 片段在 1% 琼脂糖凝胶上经 TAFE 分离，所用为 Beckman Geneline™ II 仪器 (Beckman)，按厂家说明进行。电泳参数：4Sec A，4 Sec B 脉冲时间，于 300mA 电流下 14℃ 电泳近 18h。

CHEF

大于约 50Kb 的 DNA 片段在 1% 琼脂糖凝胶上，用 CHEF-DR II 模块 (BioRad)，配备 Pulswave 760 Switcher，200/2.0 型电源及 CHEF

电泳室, 经 CHEF 电泳而分离。电泳参数: 启动时间 50 Sec, 最终时间 90Sec, 起始比率 1.0, 200V 电压下电泳 20 至 24 小时, 14℃。

定量测定 PCR 产物和杂交信号

PCR 产物和杂交信号的定量分别从溴乙锭染色的琼脂糖凝胶的照片或从放射自显影照片上, 按 ImageQuaNT™ 软件 (Molecular Dynamics) 进行。

DNA 标记和杂交

DNA 标记和杂交依照 ECL™ 直接核酸标记和检测系统 (Amersham LIFE SCIENCE, Little Chalfont, England) 进行。

在黑曲霉菌落上进行的盒式和 DNA-旗特异性 PCR 操作

将黑曲霉孢子接种于 PDA 平板 (马铃薯葡萄糖琼脂, Oxoid; 按厂家建议制备)。30℃ 生长 48 小时后, 将单个菌落菌丝体的 1/2-1/4 转移至 50 μ l novozym [5mg Novozym 234 (Novo Industries)/ 每 ml KC (0.8M KCl, 9.5mM 柠檬酸, pH6.2)], 37℃ 温育 1 小时。随后, 加入 300 μ l DNA 稀释缓冲液 (10mM Tris-HCl pH7.5; 10mM NaCl; 1mM EDTA), 悬浮液 100℃ 煮沸 5 分钟, 然后猛烈摇动破坏未受损菌丝体。以 5 μ l 这样的混合物作模板, 在 50 μ l 包含 5 μ l 10x Super Taq PCR 缓冲液 1 (HT Biotechnology 公司), 8 μ l dNTP (每种 1.25mM), 20-80ng 每种寡核苷酸和 1U Super Taq (HT Biotechnology 公司, 剑桥, 英国的 PCR 反应混合物中进行反应)。寡核苷酸的最佳用量需对每批购买的药品实验后确定。

在 DNA-扩增仪 (如 Perkin-Elmer, Hybaid) 中进行 25 个扩增循环 (每循环为: 1 分钟 94℃, 1 分钟 55℃ 和 1.5 分钟 72℃) 和最后延伸步骤 72℃ 7 分钟。

至于 DNA 旗检验, 用寡核苷酸 40/41 作引物对, phyA 盒式 PCR 检验的寡核苷酸对为 42/43, amdS 盒检验的寡核苷酸对为 15/16。随

后分析 PCR 产物, 在 TBE 缓冲液 (0.09M Tris, 0.09M H_3BO_3 , 2mM EDTA; pH8.3) 中于 2% 的琼脂糖凝胶上经电泳分析 20 μ l PCR 混合物。

黑曲霉的定向特异性 PCR 操作

DNA-模板的制备和 PCR 反应条件与进行青霉菌的定向 PCR 检验所用的一样。引物对选用寡核苷酸 46/48 以确定 amdS 盒是否打靶到 glaA 靶位点的邻位, 用寡核苷酸对 46/47 确定 phyA 盒是否打靶到 glaA 靶位点的邻位。用的 PCR 条件如青霉菌定向 PCR 检验所述。

产黄青霉转化体的定向 PCR

将近 1/3 的 4 天龄菌落于补加 5mg/ml Novozym™ 234 的 50 μ l KC 缓冲液 (60g/l KCl, 2 g/l 柠檬酸, pH6.2) 中 37℃ 温育 2 小时。随后加入 100 μ l 10mM Tris, 50mM EDTA, 150mM NaCl, 1%SDS, pH8 和 400 μ l QIAquick™ PB 缓冲液 (Quiagen 公司, Chatsworth, USA)。将提取物重新轻柔悬浮, 上样于 QIAquick™ 旋转柱。将柱置于微量离心机中 1,3000rpm 离心 1min, 再用 500 μ l QIAquick™ PE 缓冲液洗一次。乙醇残迹经最后快速旋转去除。向柱中加入 50 μ l 水, 然后于 13000rpm 离心 1min, 可从柱中洗脱出染色体 DNA (PCR 模板)。PCR 反应物包括 10 μ l eLONGase™B 缓冲液 (Life Technologies, Breda, 荷兰), 14 μ l dNTP (每种 1.25mM), 1 μ l eLONGase™ 酶混合物, 1 μ l 模板, 每种寡核苷酸 30-50ng, 终体积 50 μ l。寡核苷酸的最佳用量需对每批药实验后确定。一般用 30-50ng。反应循环条件如下: 1x (2min 94℃), 10x (15sec 94℃, 30 sec 55℃, 4min 68℃); 20x (15 sec 94℃, 30 sec 55℃, 首循环于 68℃ 4min, 然后每循环增加 20sec), 1x (10min 68℃)。将 8 μ l 样本上样于琼脂糖凝胶, 分析 PCR 产物。

产黄青霉转化体的盒式 PCR

将近 1/3 的 4 天龄菌落于加有 5mg/ml Novozym™ 234 的 200 μ l DVB 缓冲液 (10mM Tris, 10mM NaCl, 1mM EDTA, pH7.5) 中 37℃ 温育 2 小

时。混合物煮沸 8min, 随后猛烈摇动以破坏未受损菌丝体。5 μ l 这样的混合物作为 PCR 模板, 在 50 μ l 包含 5 μ l 10x Super Taq PCR 缓冲液 (HT Biotechnology 公司, 剑桥, 英国), 8 μ l dNTP (每种 1.25mM), 1U Super Taq 和 20-80ng 的每种寡核苷酸的 PCR 反应物中反应。每批寡核苷酸的最佳用量需实验确定。反应循环条件为: 25x (1min 94 $^{\circ}$ C, 1min 55 $^{\circ}$ C, 1.5min 72 $^{\circ}$ C), 1x (8min 72 $^{\circ}$ C)。将 15 μ l 样本上样于琼脂糖凝胶, 分析 PCR 产物。

染色体 DNA 分离

将黑曲霉和产黄青霉的孢子接种 100ml 锥形瓶中的 20ml 曲霉基本培养基 (见黑曲霉的转化), 30 $^{\circ}$ C 以 300rpm 的速度旋转振荡培养 20-24 小时。长成的培养物取 5-10ml 接种于 100ml 新鲜曲霉基本培养基中, 30 $^{\circ}$ C 300rpm 旋转振荡下再培养 20-24 小时。培养结束后, 经 Miracloth (Cal Biochem) 滤膜过滤收获菌丝体, 用 15ml KC 缓冲液 (0.8M KCl, 9.5mM 柠檬酸, pH6.2) 洗。每克洗过的菌丝体 (100ml 培养物中可得 3-5g) 中加 4ml KC 缓冲液和 0.25ml novozym [50mg Novozym 234 (Novo Industries)/ml KC 缓冲液], 使原生质体在 30 $^{\circ}$ C 经轻轻振荡生成。原生质体形成后, 加 KC 缓冲液, 使之达 45ml, 此原生质体悬浮液用悬桶式转头于 4 $^{\circ}$ C 3000rpm 离心 5 分钟。再将原生质体悬浮于 20ml KC 缓冲液。然后加入 25ml STC 缓冲液 (1.2M 山梨糖醇, 10mM Tris-HCl pH7.5, 50mM CaCl₂), 混匀后用悬桶式转头 4 $^{\circ}$ C 下 3000rpm 离心 5 分钟, 再悬浮于 50ml STC 缓冲液, 再用悬桶式转头 4 $^{\circ}$ C 2500xg 离心 5 分钟。向每 0.3 至 0.6ml 原生质体沉淀中加 60 μ l 蛋白酶 K (20mg/ml) 和 1ml 低溶点琼脂糖 (0.8% 溶于 1M 山梨糖醇/0.45M EDTA)。振荡混匀后, 将悬浮液转移至预先制成的 Plexiglass 模具的孔中, 置于冰上约 15 分钟。然后, 将琼脂糖塞转移至 2.5ml 十二烷基肌氨酸钠溶液 (1% 十二烷基肌氨酸钠溶于 0.5M EDTA)。加入 60 μ l 蛋白酶 K (20mg/ml), 50 $^{\circ}$ C 温育 16-20 小时后, 用 10ml 50mM EDTA 溶液替换十二烷基肌氨酸钠溶液。50 $^{\circ}$ C 温育 2 小时后, 用 10ml 新鲜的 50mM

EDTA 替换原 EDTA 溶液, 再 50℃ 温育 2 小时。最后, 再用 10ml 新鲜的 50mM EDTA 溶液替换原 EDTA 溶液, 将琼脂糖塞贮于 4℃。

对染色体 DNA 琼脂糖塞的限制酶消化

将包含 1-3 μ g 染色体 DNA 的部分 DNA 琼脂糖塞(如上述制备)于 1ml TE(10mM Tris-HCl pH7.5, 1mM EDTA)中 37℃ 温育 1 小时。重新换 1ml TE 缓冲液, 继续于 37℃ 温育 1 小时。然后 TE 缓冲液由 200 μ l 适应于每种限制酶的缓冲液(按供应商的建议)替换。37℃ 温育 1 小时后, 重新更换限制酶缓冲液(50 μ l), 65℃ 温育 10 分钟以溶解琼脂糖。最后, 加入 20-40 单位的适当限制酶, 在供应商就每种限制酶推荐使用的温度下, 使消化混合物温育 16 小时。

amdS 负选择过程

在多数衍生载体中, amdS 选择标记基因位于 DNA 重复序列之间。故, 在所识别的带有这些载体的转化体中, 去除 amdS 标记基因既可通过盒内侧翼 DNA 重复序列的内部重组也可经单交换事件而对因整合而产生的重复序列同源重组达到。选择已丢失 amdS 选择标记的细胞可通过将细胞培养于含氟乙酰胺的平板上完成。有 amdS 基因的细胞将氟乙酰胺代谢为铵盐和对细胞有毒性的氟乙酸。结果, 只有失去了 amdS 基因的细胞才能在含氟乙酰胺的平板上生长。

若要去除曲霉转化体中的 amdS 标记, 则将其孢子铺板于选择性再生培养基(上述)上, 该培养基内含 5mM 氟乙酰胺和 5mM ureum 代替 10mM 乙酰胺, 含 1.1% 葡萄糖代替 1M 蔗糖, 含 1.1% 代替 2% 的细菌学 1# 琼脂(Oxoid, England), 30℃ 生长 7-10 天后, 收获单菌落, 铺板于 0.4% 马铃薯葡萄糖琼脂(Oxoid, England)上。

若去除青霉转化体的 amdS 标记, 则将其孢子铺板于曲霉基本培养基上, 该培养基含有 10mM 氟乙酰胺和 5% 葡萄糖, 以 1.5% 细菌学 1# 琼脂(Oxoid, England)固定成形。25℃ 生长 5-10 天后, 耐药菌落出现。

大肠杆菌生物分析

转化体在 YPD 琼脂培养基上长 5 天。大肠杆菌 ESS2231 作为指示细菌用于琼脂覆盖层中，它还含有 Bacto-penase，能辨别青霉素和头孢霉素的产生，方法为本领域熟知 (Guttierrez 等, 分子普通遗传学, 1991 225:56-64)。菌落周围的琼脂覆盖层澄清即可鉴定为表达 cefE 的转化体。

产黄青霉的工业化菌株改良

利用本领域技术人员熟知的标准诱变技术和筛选过程 (Rowlands, 1984, 酶微生物技术 (Enzyme Microb. Technol.) 6:3-10), 从 Wis 54-1255 (ATCC 28089) 中分离产黄青霉菌株 CBS 649.97 (于 1997 年 4 月 11 日存于真菌菌种保藏中心, Baarn, 荷兰)。

己二酰-7-ADCA 和己二酰-7-ADAC 发酵

己二酰-7-ADCA 和己二酰-7-ADAC 的发酵生产和定量基本如对 2-(羧乙基巯基)乙酰基-和 3-(羧甲基巯基)丙酰基-7-ADCA (W095/04148) 的生产的描述, 除了加入培养基的是 3 g/l 己二酸而非 3'-羧甲基巯基丙酸。合成的己二酰-7-ADCA 和己二酰-7-ADAC 应用作为参照物质。

黑曲霉摇瓶发酵

重组及对照黑曲霉菌株的大批孢子通过将孢子或菌丝体铺板于已按供应商建议制备好的 PDA 平板 (马铃薯葡萄糖琼脂, Oxoid) 上生产。30℃ 生长 3-7 天后, 向平板中加 0.01% Triton x-100 收集孢子。用无菌水清洗后, 将所选出的转化体和对照菌株的约 10^7 个孢子接种于摇瓶中, 瓶内有 20ml 液态预培养基质, 每升内含: 30g 麦芽糖·H₂O; 5g 酵母浸出膏; 10g 水解的酪蛋白; 1g KH₂PO₄; 0.5g MgSO₄·7H₂O; 0.03g ZnCl₂; 0.02g CaCl₂; 0.01g MnSO₄·4H₂O; 0.3g FeSO₄·7H₂O; 3g 吐温 80; 10ml 青霉素 (5000IU/ml)/链霉素 (5000UG/ml); pH5.5。这些培养物于 34℃ 生长 20-24 小时。将该培养物 10ml 接种至 100ml 黑曲

霉发酵基质中, 该发酵基质每升含: 70g 麦芽糖糊精; 25g 水解的酪蛋白; 12.5g 酵母浸膏; 1g KH_2PO_4 ; 2g K_2SO_4 ; 0.5g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0.03g ZnCl_2 ; 0.02g CaCl_2 ; 0.01g $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; 0.3g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 10ml 青霉素(5000IU/ml)/链霉素(5000UG/ml); 用 4N H_2SO_4 调 pH 至 5.6。这些培养物于 34℃ 生长 6 天。对取自发酵液的样本离心(10 分钟, 5000rpm, 用悬桶式离心机), 收集上清。对这些上清进行葡糖淀粉酶或肌醇六磷酸酶活性分析(见下文)。

葡糖淀粉酶活性分析

葡糖淀粉酶活性测定如下: 将在 0.032M NaAC/HAC pH4.05 中 6 倍稀释的培养物上清样本 10 μl 与 115 μl 于 0.032M NaAc/HAc pH4.05 中的 0.2%(W/V) 对硝基苯基 α -D-葡糖吡喃糖苷(Sigma)一起温育。室温 30 分钟后, 加入 50 μl 0.3M Na_2CO_3 , 在波长 405nm 处测吸收值。 $A_{405\text{nm}}$ 定量的是 GLA 产量。

肌醇六磷酸酶活性分析

取烧瓶或微滴板黑曲霉发酵产物的 100 μl 上清(如有必要则稀释)(参照为 100 μl 双蒸水)加入 900 μl 混合物中, 该混合物包含 0.25M 醋酸钠缓冲液 pH5.5, 1mM 肌醇六磷酸(钠盐, Sigma P-3168), 37℃ 温育 30 分钟。加 1ml 10% TCA(三氯醋酸)终止反应。然后加入 2ml 试剂(3.66g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 溶于 50ml 钼酸铵溶液(2.5g $(\text{NH}_4)_6\text{MO}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 和 8ml H_2SO_4 , 用半水稀释至 250ml)。测 690nm 处对兰色的分光光度计吸收值。将测量值对照 0-1mMol/l 范围内的磷酸标准曲线可指示释放的磷酸量。

微生物的培养

带小棒链霉菌株 ATCC27064 于 27℃ 在大豆胰脏酶(tryptic)肉汤(Difco)中培养。

产黄青霉菌株于 25℃ 在完全 YPD 培养基(1%酵母浸膏, 2%蛋白胨,

2%葡萄糖)中培养。固体培养基则加 2% Bacto 琼脂。转化体的纯化通过反复在 YPD 琼脂上培养而完成。利用单个稳定菌落接种琼脂斜面以产生孢子。

黑曲霉菌株于 30℃ 在含 PDA 的平板中培养。通过反复培养于 PDA 平板上从而纯化转化体。利用单个稳定菌落再制成斜面以产生孢子。

大肠杆菌菌株的培养依照标准程序(Sambrook)。

黑曲霉实施例

1.1 黑曲霉宿主的选择和鉴定

1.1.a 原理说明

基因组中重复 DNA 区的存在是应用基因转变为工具扩增所整合的重组表达盒必需的。例如,黑曲霉葡萄糖淀粉酶高产菌株的 *glaA* 基因就可出现在这样的扩增后 DNA 区中。为了鉴定适于生产工业酶的宿主,我们筛选出具有改进的葡萄糖淀粉酶生产能力的黑曲霉菌株。在此我们描述如何选择和鉴定这些含有所要求的 DNA 扩增子的黑曲霉菌株。

1.1.b 选择黑曲霉突变体

从黑曲霉 CBS 513.88(于 1988 年 10 月 10 日存放)中选择出好几个在摇瓶水平上显示有改进的葡萄糖淀粉酶生产能力的突变菌株。对黑曲霉 CBS513.88 的孢子经紫外线处理而进行诱变。检验存活孢子(近 1%)在材料与方法部分中所述的摇瓶发酵中生产葡萄糖淀粉酶的能力。生长 6 天后按材料与方法中所述测定葡萄糖淀粉酶活性。

可选出好几株显示葡萄糖淀粉酶生产水平提高,(甚至高达 600U 葡萄糖淀粉酶/ml)的黑曲霉突变体。黑曲霉亲代株 CBS 513.88 所能达到的水平近 200U 葡萄糖淀粉酶/ml。最好的黑曲霉生产突变株已作为黑曲霉 CBS646.97 于 1997 年 4 月 11 日保藏于荷兰 Baarn 的真菌菌种保藏中心。

1.1.c 黑曲霉 CBS646.97 的遗传定性

为测定上述葡糖淀粉酶生产的增加是否 *glaA* 位点扩增的结果, 从黑曲霉突变株 CBS646.97 及其亲代黑曲霉 CBS513.88 分离染色体 DNA。对其进行 Southern 分析, 用 *EcoRI* 和 *SalI* 消化, 并以葡糖淀粉酶/肌醇六磷酸酶 DNA 片段(*glaA/phyA* 融合体: 来自 pFYT3 的 *EcoRI/BamHI* 片段, 描述于 EP 专利申请 0420358A1)) 为探针探查。放射自显影清楚地显示, 葡糖淀粉酶改进型突变株包含多个 (3-4 个) *glaA* 基因拷贝。

1.1.d 黑曲霉突变株中 *glaA* 扩增子的大小

TAFE 分析揭示所选黑曲霉突变株中的大 DNA 片段均得到扩增。按材料与方法所述从黑曲霉初始株 CBS513.88 及黑曲霉 CBS646.97 株中分离染色体 DNA。用 *HindIII* 和八碱基限制酶 *NotI*, *SwaI*, *AscI* 和 *PacI* 消化, 再用来自 pAB6-1 (见 EP 专利申请 0357127A1) 的几个 *glaA* 位点特异性探针对其进行 TAFE 分析。亲代株和突变株之间在由上述限制酶处理的 *glaA* 杂交性 DNA 片段的大小方面没有区别。

测得最大杂交 DNA 片段各例均有, 限制酶 *SwaI* 消化片段: 近 80Kb。唯一所见区别在于 *glaA* 杂交性 DNA 带的强度。尽管很难对杂交 *glaA* 带的强度准确定量, TAFE 放射自显影仍清楚地显示黑曲霉突变株 CBS646.97 包含额外拷贝的所见 *glaA* 扩增子。

此外, 我们无法找到另一个在所检测的 *glaA* 扩增子以外切割的限制酶。这意味着 *glaA* 扩增子包含至少 80Kb 或更大。

1.2 在黑曲霉 CBS646.97 株的各扩增子上修饰 *glaA* 位点

1.2.a 原理说明

如前述 (EP 专利申请 0635574A1), 可用“无标记基因”法在黑曲霉中适当缺失一个基因组靶基因。在那个专利申请中, 有一个实施例广泛描述了如何在黑曲霉 CBS513.88 的基因组中缺失 *glaA* 特异性 DNA 序列。所述置换型载体通过双交换同源重组整合进黑曲霉 *gpdA* 基因组

序列中。缺失载体包含同源于 *glaA* 靶位点的 DNA 区，还包含由 *glaA* 启动子序列驱动的 *amdS* 选择标记基因。此外，此载体中 *amdS* 选择标记基因两侧均是 *glaA* 序列，它们是直接 DNA 重复序列，可促进随后 *amdS* 标记基因的恰当消失。

这样的载体指导 *amdS* 标记基因取代 *glaA* 基因。随后对这些转化子进行氟乙酰胺反选择，*amdS* 标记基因可通过 3'-*glaA* DNA 直接重复序列之间的内部重组而正确缺失，从而产生最终不含任何外源 DNA 序列的无标记基因型 Δ *glaA* 重组黑曲霉 CBS513.88 菌株。

显然这种“无标记基因”法尤其适用于反复修饰和缺失宿主基因组序列。

此实施例描述了用三个一套“特别设计的”pGBDEL 置换型载体所进行的三轮连续转化过程中，黑曲霉 CBS646.97 的所有 *glaA* 启动子及编码序列的恰当缺失。为了进行这三轮缺失，构建并应用到多于三个或少于三个的一套相同的 *glaA* 基因置换型 pGBDEL 载体。每个 pGBDEL 载体中有一个唯一的限制酶识别 DNA 序列，目的是经 Southern 分析而从衍生的 Δ *glaA* 重组黑曲霉菌株中单独识别并显示每个截短的 *glaA* 位点(述于实施例 1.2. e)。每个 pGBDEL 载体中的唯一限制位点位于截短的 *glaA* 位点 5' 边缘。然而，每个 pGBDEL 载体中用于指导基因置换载体打靶到其中一个 *glaA* 位点的各种 *glaA* 序列稍有不同。结果黑曲霉宿主中每个截短的 *glaA* 位点也略有不同。包含这种微小差异是为了在用快速 PCR 检验即所谓“DNA-旗”检验(图 1) 分析菌落时能显示每个截短的 *glaA* 位点。尽管非必需，但这种掺入 DNA 特点结合本文所述发生于黑曲霉 *glaA* 扩增子之间的基因转变表型，对于监控打靶到黑曲霉宿主中三个截短 *glaA* 位点之一处的(肌醇六磷酸)表达盒的扩增这一“建造”过程将特别有用。有关利用黑曲霉中 *glaA* 扩增子之间的转变事件衍生 rDNA 菌株以生产酶的这一“建造”过程将详述于下文(实施例 1.5 和 1.6)。

1.2. b *glaA* 置换型 pGBDEL 载体的描述

构建的 pGBDEL 置换型载体包含:

- 2Kb 大小的 5'-glaA 靶序列, 始于 HindIII 位点, 直至 glaA 启动子序列内 XhoI 单切点上游 200bp (pGBDEL-5)、180bp (pGBDEL-9) 和 140bp (pGBDEL-11);
- 2Kb 大小的 3'-glaA 靶序列, 从 glaA 终止密码至 SalI 位点;
- amdS 基因作为选择标记, 受控于 gpdA 启动子;
- 两个 1Kb 大小的 3'-glaA DNA 直接重复序列, 用于促进后续 amdS 选择标记基因的去除; 和
- 一个额外的限制位点 (pGBDEL-5 中为 BamHI 位点, pGBDEL-9 中为 SalI 位点, pGBDEL-11 中为 BglII 位点), 位于 glaA 截短处。

通过应用这些 pGBDEL 置换型载体, 黑曲霉宿主中包含 2Kb 大小的 glaA 启动子序列 (在 pGBDEL-5, pGBDEL-9, pGBDEL-11 中分别为 XhoI 上游 200bp, 180bp 或 140bp) 直至 ATG 起始密码子和完整 glaA 编码序列的 4.3Kb glaA 序列将缺失。图示见图 2。

1.2.c pGBGLA 中间载体的构建

为构建中间载体 pGBGLA16, 合成两个包含限制酶: NotI, EcoRI, KpnI 和 XhoI 识别位点的寡核苷酸 (30/31)。寡核苷酸 5'-末端衔接上一个 HindIII 限制位点, 3'-末端衔接上一个 EcoRI 限制位点。将该寡核苷酸插入 pTZ18R 则 EcoRI 位点将被破坏。

寡核苷酸 30 和 31 均克隆进质粒 pTZ18R 的 EcoRI 和 HindIII 位点。进行监控消化, 以确定所需 KpnI, XhoI, NotI 和 HindIII 酶限制位点是否已正确掺入, EcoRI 位点是否已遭破坏。衍生所得质粒命名为 pTM1 (见图 3)。

从 pTM1, 经 EcoRI 和 KpnI 限制酶消化后通过凝胶电泳分离并纯化出 EcoRI/KpnI DNA 片段, 以插入 pGBDEL4L 中包含 P_{gpdA} /amdS 序列的 EcoRI/KpnI 片段, pGBDEL4L 的构建详述于我们的以前专利申请

(EPA0635574A1) 中。pGBDEL4L 用 EcoRI/KpnI 和 XhoI 消化(XhoI 是为了避免克隆另一个大小相同的 pGBDEL4L DNA 片段)。包含 $P_{gpdA}/amdS$ 序列的正确 EcoRI/KpnI DNA 片段经凝胶电泳纯化, 并克隆进 pTM1 的 EcoRI/KpnI 位点。此中间载体命名为 pGBGLA16(见图 3)。

为在 pGBGLA16 中正确插入大小为 2.2Kb 的 3'-glaA 序列, 该片段首先需进行一些修饰。用 pAB6-1 为模板, 两套寡核苷酸(32/33 和 34/35)为引物进行融合 PCR, 以破坏 2.2Kb 3'-glaA 序列内的 KpnI 限制位点, 并在 5'-边界(KpnI)和 3'-边界(XhoI, HindIII) 产生相应克隆位点。模板 pAB6-1 在 pUC19 中包含一个大小为 16Kb 的 Hind III 大片段, 内含 glaA 基因组位点(其分子克隆详述于 EPA 0357127A1)。

在第一轮 PCR 中, 用寡核苷酸 32 和 33 为引物扩增 3'-glaA 序列的一部分(1Kb)。第二轮 PCR 中, 用寡核苷酸 34 和 35 扩增 3'-glaA 侧翼中剩下的 1.2Kb 序列。

经凝胶电泳纯化后, 两个扩增片段作为模板, 用寡核苷酸 32 和 35 作引物对进行融合 PCR。该 PCR 融合的图示见图 4。

所获 2.2Kb 3'-glaA PCR 融合片段经凝胶电泳纯化, 用 KpnI 和 XhoI 消化, 并经分子克隆插入 pGBGLA16 的 KpnI/XhoI 位点, 产生 pGBGLA18(见图 4)。

1.2.d glaA 置换型 pGBDEL 载体的构建

为获得三个最终的 pGBDEL 载体, 需将 5'-glaA 靶序列、每个载体所需的唯一限制位点及作为直接重复序列的 1Kb 3'-glaA 序列插入 pGBGLA18 的 Hind III/NotI 位点。为此, 进行三次不同的融合 PCR, 以构建 pGBDEL5, -9 和-11。

构建 pGBDEL5

用两个合成寡核苷酸进行第一轮 PCR, 以在 3' 边界修饰 5'-glaA 靶序列, 这两个寡核苷酸其一为 36, 包含 pUC19 核苷酸序列的一部分

和 5'-glaA 序列的 HindIII 位点；另一为 37，与 glaA 启动子中 XhoI 位点上游约 200bp 处匹配，其包含一个额外的 BamHI 位点，所有读框均有的终止密码及 1 Kb 3'-glaA 直接重复序列的最初 18 个核苷酸(5'-边界)。用两个寡核苷酸 38 和 39 进行第二轮 PCR，以在 5'-边界修饰 3'-glaA 直接重复序列，其中 38 为 37 的逆向，39 相配对于 3'-glaA 直接重复序列中 EcoRI 位点附近的序列，并另附加 XbaI 和 NotI 位点(分别适用于克隆进 pTZ18R 和 pGBGLA18 中)。两轮 PCR 均以 pAB6-1 为模板。两轮 PCR 的扩增 DNA 片段均用凝胶电泳分离，并作为模板，以 36 和 39 为引物进行融合 PCR。所获 3Kb 大小的 DNA 融合片段经凝胶电泳纯化，经 HindIII 和 NotI 消化，再分子克隆进入 pGBGLA18 的恰当位点，产生第一个基因置换型载体 pGBDEL5(见图 5)。

构建 pGBDEL9

第一轮 PCR 用寡核苷酸 36 和 49 进行，49(如上述)与 glaA 启动子中 XhoI 位点上游约 180bp 处匹配，它包含一个额外的 SalI 位点，所有读框均有的终止密码及 1Kb 3'-glaA 直接重复序列的最初 18 个核苷酸(5'-边界)。用与 49 逆向的寡核苷酸 50，以及 39 进行第二轮 PCR，以在 5'-边界修饰 3' glaA 直接重复序列。两轮 PCR 均以 pAB6-1 为模板。扩增片段经凝胶电泳分离，用作融合 PCR(以寡核苷酸 36 和 39 为引物)的模板。所获 3Kb 大小的 DNA 融合片段经凝胶电泳纯化，用 HindIII 和 NotI 消化，再分子克隆进 pGBGLA18 中的恰当位点，产生第二个 glaA 基因置换型载体 pGBDEL9(见图 6)。

构建 pGBDEL11

第一轮 PCR 用寡核苷酸 36 和 51 进行，寡核苷酸 51 与 glaA 启动子中 XhoI 位点上游的约 140bp 处配对，它包含一个额外的 BglII 位点，所有读框均有的终止密码及 1Kb 3'-glaA 直接重复序列的最初 18 个核苷酸(5'-边界)。用寡核苷酸为 52 和 39 进行第二轮 PCR，以在 5'-边界修饰 3'-glaA 直接重复序列，其中 52 为 51 的逆向。

两轮 PCR 均以 pAB6-1 为模板, 扩增片段均用凝胶电泳分离并作为融合 PCR 的模板(以 36 和 36 为引物)。所获 3Kb 大小的 DNA 融合片段经凝胶电泳纯化, 用 HindIII 和 NotI 消化, 再分子克隆进 pGBGLA18 的恰当位点, 产生第三个基因置换型载体 pGBDEL11(见图 7)。

1.2.e 黑曲霉中 glaA 启动子和编码序列的缺失及特异性“DNA-旗”的掺入。

本实施例描述了用 pGBDEL 载体和“无标记基因”(MARRER-GENE FREE)技术进行三轮成功的转化, 缺失黑曲霉 646.97 中的所有三个 glaA 基因。

用 XhoI 和 HindIII 使 pGBDEL 载体线性化, 并基于事实: rDNA 盒侧翼是与宿主基因组的 glaA 靶位点同源的 DNA 序列, 可通过宿主某个 glaA 位点上的双交换事件使 pGBDEL 载体掺入, 使 glaA 序列被 pGBDEL 载体上截短的 glaA 位点取代。然而, pGBDEL 载体通过双交换事件打靶的频率有限, 并取决于宿主的 glaA 基因组靶位点数。故尽管用了双侧均包含大小为 2 Kb 的 glaA 同源区的线性载体, 但大部分产生的转化体仍包含随机整合的载体。

然而, 有所需遗传特征的转化体易于选择并检定, 可用 a) 基于 PCR 的 DNA 旗检验, b) 定向特异性 PCR 过程和 c) 详细的 Southern 分析(如材料与方法中所说明的)。

最后, 一旦经遗传检定了正确的转化体, 使用氯乙酰胺反选择过程去除 amdS 基因。由于掺入的 3-glaA DNA 重复序列为 Pgpda/amdS 标记基因盒的侧翼, 每轮后 amdS 选择标记均因内部重组事件而去除。对如此获得的修饰的黑曲霉菌株进行多轮转化, 以去除和修饰所剩 glaA 位点。

用 pGBDEL5 修饰黑曲霉 CBS646.97 中的第一个 glaA 扩增子

用 5 μ g 线性化 (HindIII/XhoI)pGBDEL5 DNA 转化黑曲霉 CBS646.97。在含乙酰胺的选择性平板上选择转化体, 重复生长于选择

培养基后制备孢子。

选择出限制数目的转化体并分离染色体 DNA, 用 KpnI 和 BamHI 消化, 并以 5'-glaA Hind III/XhoI 和 2.2Kb SalI 3'-glaA 片段为探针进行 Southern 分析。见图 8, 比较了宿主菌株的 Δ glaA 位点和转化体中两个剩余 Δ glaA 位点的 BamHI 杂交模式。

选择出示有预期杂交模式的转化体(如图 9 示)。

随后, 对这些转化体进行反选择。将孢子接种于含氟乙酰胺的培养基(详见材料与方法)上。平均有所接种孢子的 1-2%可在这些选择条件下生长。直接对长成菌落的菌丝体用 amdS 特异性寡核苷酸 15 和 16 作引物进行盒式 PCR 分析, 揭示所有生长细胞均为重组细胞, 丢失了 amdS 标记基因。

奇怪的是, 对许多重组细胞进行详细的 Southern 分析显示, 大多数杂交模式(约 90%)为亲代株 646.97 特征型, 而不是所预期的一个截短 glaA 位点和剩下两个无损 glaA 位点的杂交模式。此外, 杂交 DNA 片段的强度显示 glaA 扩增子的数量在这些 amdS 阴性菌株中并未减少。约 10%的细胞显示预期的杂交模式(如图 10 示)。故, 那些细胞中, amdS 标记基因确实经旁侧的 3'-glaA 直接重复序列间的内部重组而缺失, 如预期的那样。

多数 amdS 阴性菌株中这一预料之外的重组事件只能解释为一种称为基因转变的遗传现象的发生。这一特征后来(见实施例 1.5 和 1.6)用于对定向在黑曲霉 CBS646.97 宿主截短的 glaA 扩增子的酶编码表达盒进行扩增。

显示有针对一个截短的 glaA 位点和两个无损 glaA 位点的杂交模式的一个 amdS 阴性菌株(如图 10), 命名为黑曲霉 GBA-201, 用 pGBDEL-9 对其进行第二次转化。

用 pGBDEL9 修饰黑曲霉 CBS646.97 中的第二个 glaA 扩增子。

用 5 μ g 线性化(Hind III/XhoI)pGBDEL9 DNA 转化黑曲霉 GBA-201。同样在含乙酰胺的选择平板上选出转化体, 并经重复培养于选择

培养基而制备孢子。因为 pGBDEL9 的打靶也可发生在以前被 BamHI 标记的宿主 glaA 截短位点，只筛选出显示仍有该截短“BamHI” glaA 位点的那些转化体，并经 Southern 分析。为此，先对这些转化体的菌丝体进行基于 PCR 的“DNA-旗”检验。只对那些显示“BamHI”截短 glaA 位点特征性的 200bp DNA 片段的转化体进行 PCR 分析，再经 Southern 详细分析，如上述。

随后，显示正确杂交模式(图 10)的转化体孢子接种于含氟乙酰胺的培养基(详见材料与方法)上。同样，平均 1-2%的接种孢子能生长在这些选择条件下。所有这些孢子似乎均丢失了 amdS 基因，用盒式 PCR 检验分析这些菌落的菌丝体揭示了这一点。

作为第二选择标准，进行了“DNA-旗”检验。只对那些显示所预期 DNA 旗模式(200 和 220bp 两条带，分别为“BamHI”截短 glaA 扩增子和“SalI”截短 glaA 扩增子的特征模式)的转化体如上述进行详细 Southern 分析。

显示两个截短 glaA 扩增子和一个无损 glaA 扩增子的杂交模式(图 12)的一个 amdS 阴性菌株，命名为黑曲霉 GBA-202，用 pGBDEL-11 对它进行第三次转化。

用 pGBDEL11 修饰黑曲霉 646.97 的第三个 glaA 扩增子

用 5 μ g 线性化(Hind III/XhoI)pGBDEL-11 DNA 转化黑曲霉 GBA-202。同样在乙酰胺选择平板上选出转化体并重复培养于选择培养基上获得孢子。同样在本例中，pGBDEL11 的打靶可发生在以前的宿主 glaA 截短扩增子上。通过“DNA-旗”检验，只选择出那些仍显示有 200 和 220bp 片段(表示前两个截短的“BamHI”和“SalI” glaA 扩增子)的转化体，对其进行 Southern 分析。

对显示如图 13 的正确杂交模式的转化体进行反选择程序，以获得无标记基因的重组体。同样，只有 1-2%的接种孢子能在这些选择条件下生长。它们经应用 amdS 盒式 PCR 检验其菌丝体发现均丢失 Pgpda/amdS 标记基因盒。

“DNA-旗”检验作为第二选择标准也执行了。只对那些显示有所预期三条带 200, 220 和 300bp DNA 旗模式的转化体进行如上述的详细 Southern 分析, 这三条带分别指示 “BamHI”, “Sal” 和 “BglII” 截短的 *glaA* 扩增子的存在。

显示有所有三个截短 *glaA* 扩增子的杂交模式(图 14)的一个 *amdS* 阴性菌株命名为黑曲霉 ISO-505。

1.3 描述并构建 pGBAAS-1 和 pGBTOPFYT-1 表达载体

1.3.a 原理

将包含一种酶的表达盒的 pGBTOP 载体, 与含 *amdS* 选择标记基因的命名为 pGBAAS-1 的载体共转化黑曲霉宿主菌株后被导入该菌株。两个载体均含有两个同源于黑曲霉宿主菌株 *glaA* 位点的 DNA 区, 可指导线性化质粒对黑曲霉 ISO-505 的其中一个截短的 *glaA* 位点打靶。这些区, 每个约 2Kb 大, 均同源于 *glaA* 序列下游非编码区, 并均特异为 3'-和 3"-*glaA* 区。这些区之间掺入了一个唯一的限制位点(pGBAAS-1 中为 *Xho*I, pGBTOPFYT-1 中为 *Hind*III), 以便在转化前经消化去除大肠杆菌 pTZ18R 克隆载体后获得几乎完全互补于宿主 *glaA* 靶位点的 DNA 限制酶末端。

pGBAAS-1 中 *amdS* 基因受强 *gpdA* 启动子驱动。应用这样一个启动子, 获得的大多数转化体将只有一个单独整合的选择标记盒。具有这样的转化体是进行后续步骤所严格要求的。后续步骤为应用前述“无标记基因”技术选择无标记基因型重组菌株。多个 *amdS* 基因的存在, 当然会影响在“一步反选择过程”中去除它们的频率, 甚至可能无法去除。

pGBTOPFYT-1 中的 *phyA* 受 P_{glaA} 驱动。如已述, 该载体的组成可设计成使线性化表达盒整合在黑曲霉 ISO-505 的其中一个 *glaA* 靶位点上。为了在一次转化中获得带有多拷贝表达盒但只有单拷贝协同载体(最终获得无标记基因型重组菌株所必需)且均打靶到宿主基因组的相同 *glaA* 靶位点上的转化体, 两种盒的线性化 DNA 片段的比例须严格

控制。

3.1.b 构建整合载体 pGBAAS-1

有关构建 pGBAAS-1 的所有细节均可在我们以前的专利申请 EPA 0635574A1 中找到。在该专利申请中，详细描述了 amdS 选择标记基因载体 pGBGLA-50 的构建。只是因命名的理由，后来这个载体重新命名为 pGBAAS-1 (AAS 意为曲霉菌 amdS 穿梭型)。物理图谱见图 15。

3.1.c 构建整合载体 pGBTOPFYT-1

1. pGBTOPFYT-1 的构建也可在上述相同专利申请中找到。该专利申请中详细描述了肌醇六磷酸酶表达载体 pGBGLA-53 的构建。同样仅因为命名，该表达载体后重新命名为 pGBTOPFYT-1 (TOP 意为过度表达蛋白质的工具)。物理图谱见图 16。

1.4 开发无标记基因型的肌醇六磷酸酶黑曲霉生产菌株，它包含一个或多个肌醇六磷酸酶表达盒，诸盒均打靶到黑曲霉 ISO-505 的其中一个截短 glaA 扩增子中。

1.4.a 原则说明

本实施例的目的是显示，表达盒(一个或更多拷贝)可通过与带有选择标记基因的载体共转染而正确导向宿主细胞基因组中的预定靶位点。第二是要显示，如何通过内部重组去除选择标记基因盒而又不丢失打靶的酶表达盒。

本例中选择的靶位点为 4Kb glaA 序列，就位于 glaA 终止密码的下游。

线性化质粒 pGBTOPFYT-1 和 pGBAAS-1 的整合通过黑曲霉 ISO-505 菌株的其中一个截短并标记的 glaA 位点处发生单交换而成。

为最终选择无标记基因型重组体，只筛选出那些有两个质粒以适当方式打靶到宿主基因组的同一已标记 glaA 位点的转化体，对其进行随后的氯乙酰胺反选择过程。

1.4.b 用线性化 pGBAAS-1 和 pGBTOPFYT-1 DNA 共转化黑曲霉 ISO-505.

pGBAAS-1 和 pGBTOPFYT-1 分别用 XhoI 和 HindIII 消化而成为线性。经凝胶电泳去除 2.8Kb 的大肠杆菌克隆序列后用于转化。用 1 μ g pGBAAS-1 线性化 DNA 比 5 μ g pGBTOPFYT-1 线性化 DNA 的比例, 如材料与方法所述转化黑曲霉 ISO-505。在乙酰胺平板上选出转化体。其孢子经将单菌落铺板于 PDA 平板上而分离得到。对约 500 个转化体进行盒式 PCR 检验。

1.4.c 共转化体的选择

具有 amdS 标记基因及 phyA 表达盒的转化体用肌醇六磷酸酶特异性寡核苷酸 42/43 作引物经盒式 PCR 检验而鉴别出来。含有一个或多个 phyA 表达盒的阳性转化体应显示一条大小为 482bp 的特异 DNA 带。共转化频率变化范围在 10-50%之间。

1.4.d 定向的 amdS⁺, phyA⁺共转化体的选择

对所鉴别的共转化体用两套寡核苷酸 46/47(第 1 套引物)和 46/48(第 2 套引物)进行定向 PCR 检验。挑选出用这两套引物中的一套有阳性结果(扩增了 4.2Kb DNA 片段, 见图 17)的共转化体。阴性结果说明所有盒都是随机整合的, 用第 1 套引物或第 2 套引物有阳性结果暗示 phyA 或 amdS 分别位于 glaA 靶位点的邻近位点。5-50%的共转化子表现为阳性。选出有限量的所鉴定菌株进一步进行 Southern 分析。

1.4.e 用 Southern 分析对 amdS 打靶和 phyA 打靶的共转化体进行遗传分析

分离染色体 DNA, 用 BglIII 消化, 以 amdS 和 2.2 Kb SalI/XhoI 3'-glaA DNA 片段为杂交探针进行 Southern 分析。最经常观察到的 6 种杂交模式图示于 18-23 图。对显示有单个 amdS 拷贝, 一个或多个

phyA 表达盒的特征性杂交模式(图 20-23)的共转化体进行氟乙酰胺反选择过程, 以最终去除 amdS 选择标记基因。

1. 4. f 选择不含 amdS 基因 (amdS⁻) 的肌醇六磷酸酶生产菌株。

因 amdS 表达盒的定向整合而形成的直接重复序列之间的重组将导致 amdS 盒的丢失, 并可在氟乙酰胺培养基上进行选择。这里我们描述经应用氟乙酰胺反选择过程选择仍包含相邻的(多个)整合 phyA 表达盒而无 amdS 的重组菌株。将所选出的打靶 amdS⁺/phyA⁺共转化体的孢子铺板于氟乙酰胺平板。首先, 通过几轮连续地基于 PCR 的检验分析生长的菌落。先检验所有子代的基因型是否 amdS⁻。方法是用 amdS 特异性引物如材料与方法中所述对菌落进行盒式 PCR 检验。令人惊讶的是, 在后续基于 PCR 的“DNA-旗”检验中, 似乎大多数子代同时也丢失了完整的 glaA 扩增子。此外, 大多数 amdS⁻重组体中, 打靶的 phyA 盒也失去了, 这是在应用 phyA 特异性引物对进行的第三轮 PCR 检验中发现的。

这些结果只可解释为发生了基因转变这一现象。好几个例子中, 极大的 DNA 片段或甚至完整 glaA 扩增子($\geq 80\text{Kb}$)由另一个 glaA 扩增子所取代。然而, 大多数子代(超过 90%)中似乎缺失了一个完整 glaA 扩增子。因而, 为全面说明所观察的结果, 称为扩增子转变和缺失更为恰当。利用所观察到的现象确定是否共转化体中的所有 amdS 和 phyA 盒均整合在同一个截短的 glaA 位点以及具体是哪一个。为确定这一点, 用 phyA 和“DNA-旗”寡核苷酸引物对进行混合 PCR 只检验每个共转化体的 1 个或两个氟乙酰胺抗性菌落, 看它们中哪一个基因型为: amdS⁻/phyA⁻/glaA-扩增子²⁺。结果显示, 可以获得具有整合在三个 glaA 扩增子之一的 amdS 和 phyA 盒的共转化体。

随后, 用 phyA 和“DNA-旗”引物对经混合 PCR 检验对来自如此鉴别出的共转化体的其它子代进行检测。所需 amdS⁻/phyA⁺/glaA 扩增子³⁺基因型的出现在各个共转化体的子代之间差别很大(1 至 20%)。该频

率似乎极大地取决于先选出的共转化体的 *glaA* 扩增子内 *amdS* 和 *phyA* 盒的遗传组成。

如果在一个共转化体中多个盒打靶到一个 *glaA* 位点, 将产生许多重复序列。氟乙酰胺反选择的结果是 *amdS* 盒的丢失各不相同, 从而产生的 *amdS*⁻ 子代有不同数目的 *phyA* 盒。

因此而选择出每个先选出的共转化体的好几个子代重组体(都显示有所需基因型 *amdS*⁻/*phyA*⁺/*glaA* 扩增子³⁺, 但包含不同数目的剩余 *phyA* 盒)。

对这些子代菌株的预选择可通过比较在上述 PCR 检验中扩增的 *phyA* 特异性 DNA 带与代表三个 *glaA* 扩增子的 DNA 带的强度差异而轻易完成。

最后, 为确证所选 *amdS* 子代的遗传组成, 染色体 DNA 用 *Bam*HI 和 *Bgl*III 消化, 再与 2.2Kb *Sal*I/*Xho*I 3'-*glaA* DNA 片段这一特异性探针杂交进行 Southern 分析。选出有图 24 所示杂交模式、具有 1, 2, 或 3 个 *phyA* 盒整合在一个 *Bam*HI 标记的 *glaA* 扩增子中的菌株, 分别命名为黑曲霉 NP505-1, -2, 和-3。

这些菌株, 及其另二个 *glaA* 扩增子之一上有肌醇六磷酸酶盒的那些菌株, 均随后检验了它们产生肌醇六磷酸酶的能力。

按材料与方法所示进行摇瓶发酵。上清中肌醇六磷酸酶活性的测量揭示所有菌株的每个 *phyA* 基因拷贝产生相同量的肌醇六磷酸酶(100U/ml), 并似乎与 *phyA* 基因所在的 *glaA* 扩增子无关。

1.5 选择所含肌醇六磷酸酶盒由 1 增至 2 的转版本

1.5.a 原理说明

打靶到某 DNA 扩增子的表达盒可通过基因转变增加拷贝数。结果该基因编码的酶产量增加。这里我们描述了对显示肌醇六磷酸酶产量增加的 *phyA* 转化体的选择和鉴定。

1.5.b 对推定 phyA 转化体的选择

选黑曲霉 NP505-2 菌株作为实例。也可用有更少或更多 phyA 盒定向于另一个 glaA 扩增子的重组菌株。取有两个 phyA 盒定向于 BamHI 标记的 glaA 扩增子的黑曲霉菌株 NP505-2, 将其孢子接种在含 PDA 培养基的平板上, 2-3 天后用 phyA DNA-旗特异性引物对单菌落进行 DNA-旗检验(见材料与方法)。用这种方法可很快看到发生在三个标记 glaA 扩增子之间的遗传交换(转变/扩增或缺失)。尽管所得基因型的频率差异很大, 但平均观察到超过 95% 的受检菌落显示所有三个 glaA 扩增子根本无任何改变。5% 的子代显示或缺失了一或两个 glaA 扩增子, 或扩增了其中一个 glaA 扩增子, 也检测到所需转版本, 是 BamHI 标记的 glaA 位点和其他两个 glaA 扩增之一之间的转变(每个的实施示于图 25)的结果。

1.5.c phyA 转版本的 Southern 分析

为确定这些转化体中 phyA 的拷贝数是否也倍增了, 对好几个这样的转化体(基因型 $\text{BamHI}^{2+}/\text{SalI}^{+}/\text{BglIII}^{-}$ 或 $\text{BamHI}^{2+}/\text{SalI}^{-}/\text{BglIII}^{+}$) 进行进一步 Southern 分析: 即用 BamHI 和 BglIII 消化, 并分别以 glaA 特异性的 Hind III/XhoI 5' glaA DNA 片段和 SalI/XhoI 3'-glaA DNA 片段为探针。

亲代菌株及所选转版本的 BamHI 消化物的杂交模式均示于图 25。如所预料, 并与亲代黑曲霉菌株 NP505-2 比较, PCR 鉴别的 BamHI^{2+} 基因型显示, BamHI 消化物中 2.5Kb 和 4.2Kb 杂交 DNA 片段的强度确实相反。在 BamHI^{2+} 基因型中, 2.5Kb 片段表示两个 BamHI 标记的 glaA 扩增子, 4.2Kb 片段为所剩 SalI 或 BglIII glaA 扩增子(取决于所选 BamHI^{2+} 转版本的基因型)。观察结果清楚地显示, 预定扩增子可通过牺牲另一相关扩增子的“基因转变”而增加。

BglIII 消化物的杂交模式清楚显示, 所选 BamHI^{2+} 转版本中, phyA 基因拷贝数也增加一倍。如图 26 示, 亲代株染色体 DNA 的 Bgl III 消化物用 3'-glaA 片段作探针显示有 5 个杂交 DNA 片段。5 条带 14.9,

11.7, 7.5, 5.7 和 5.6kb 分别代表 glaA 序列 5' 侧翼, SalI 标记的扩增子, phyA-phyA 转换, glaA 序列 3' 侧翼和 BglIII 标记的 glaA 扩增子。亲代菌株中所有这些带的杂交强度大致相同。亦如图 26 示, 所选基因型为 $BamHI^{2+}/SalI^{+}/BglIII^{-}$ 或 $BamHI^{2+}/SalI^{-}/BglIII^{+}$ 的转版本中分别缺失了所述 5.6Kb 或 11.7Kb 的 DNA 片段, 而 14.9, 7.5 和 5.7Kb 杂交片段的强度加倍了。

这一结果说明, 位于亲代株 BamHI 标记的 glaA 扩增体内的 2 个 phyA 盒也通过转变事件而在所选出的 $BamHI^{2+}$ 转版本中增加了一倍。

1.5.d 分析 phyA 转版本的肌醇六磷酸酶生产

为确定选出的 phyA 转版本中肌醇六磷酸酶产量是否确实增加, 按材料与方法中所述进行摇瓶发酵。

亲代株 NP505-2 (有 2 拷贝 phyA 基因) 的平均肌醇六磷酸酶表达为约 200U/ml 的水平。如所预料, 选出的两个转变体 $BamHI^{2+}/SalI^{+}$ 或 $BamHI^{2+}/BglIII^{+}$ 的肌醇六磷酸酶水平可测出高达 400U/ml。

这两株菌命名为黑曲霉 NP505-4 和-5, 用于实施例 1.6 以进一步增加 phyA 基因的拷贝数。

1.6 选择含多个修饰的 DNA 扩增子的转版本

1.6.a 原理说明

对打靶到宿主菌株中其中一个 DNA 扩增子内的表达盒的扩增可以只需通过筛选亲代菌株的子代, 并选择那些发生了所需转变的重组菌株而达到。尽管程度低, 如上述, 但这些 DNA 扩增子之间的转变是自发的。这一基因转变过程可反复应用, 产生的新转版本可具有数目增多的 (phyA) 修饰 DNA 扩增子。通过应用这种方法, 我们已鉴别出一个转版本, 它最终有 6 个 phyA 基因拷贝, 均等地分配于黑曲霉 ISO-505 宿主中的三个已修饰 glaA 扩增子内。

“酶表达盒增加”的程度取决于宿主菌株中最初具有的 DNA 扩增子的数目。然而, 通过应用此基于 PCR 的 DNA-旗检验, 似乎可能分离

到带有 DNA-旗特征的子代, 这种现象只能解释为三个 glaA DNA 扩增子之一发生了自发扩增。反复利用这一点, 最终可选出比宿主菌株的 glaA DNA 扩增子多、每个扩增子均含 2 个 phyA 表达盒的重组菌株。

1.6.b 选择推定含 6 拷贝 phyA 基因的转版本。

将述于实施例 1.5. (d)、共有 4 个 phyA 表达盒(每个 BamHI 标记的 phyA 扩增子中有 2 个 phyA 盒)的黑曲霉菌株 NP505-4 的孢子接种在 PDA 平板上, 2-3 天后用 DNA-旗特异性引物对单个子代进行 DNA-旗 PCR 检验。如前文声明的, 又有约 95% 的受检菌落显示其 glaA 扩增子的基因型未变。约 5% 的子代显示指示其中一个 BamHI-或 SalI-标记的扩增子有缺失或甚至指示其中一个 BamHI-标记的 glaA 扩增子有自发扩增的 DNA-旗模式。除这些重组菌株以外, 还鉴定出有所需 DNA-旗模式的转版本, 其 200bp 大小的 BamHI DNA-旗带强度略有增加。对所有显示基因型为 “BamHI³⁺” 和 “BamHI³⁺/SalI⁺” 的子代菌株均进行 Southern 分析。

为使 “BamHI³⁺/SalI⁺” 转版本中的 phyA 基因增至 8 个, 将其孢子接种于 PDA 平板上, 长 2-3 天后, 用 DNA-旗特异性引物对单个子代进行 DNA-旗 PCR 检验。以一个极低频率(1/1000)检测到变显示的 DNA-旗模式伴有大小为 200bp 的 BamHI-旗 DNA 片段强度增加且随后丢失所剩大小为 220bp 的 SalI-旗 DNA 片段的 “BamHI⁴⁺” 转版本(图 27)。对该转版本菌株也进行 Southern 分析。

1.6.c 经 Southern 分析对转版本进行遗传鉴定

上述鉴定出的转版本(基于 PCR 的基因型为 “BamHI³⁺”, “BamHI³⁺/SalI⁺” 和 “BamHI⁴⁺”)的 phyA 基因拷贝数通过用 BamHI 和 BglIII 消化物, 并分别与 Hind III/XhoI 5'-glaA 和 SalI/XhoI 3'-glaA 特异性 DNA 片段这样的探针杂交, 如此 Southern 分析测定。亲代转版本(基因型为 BamHI²⁺/SalI⁺/BglIII⁻或 BamHI²⁺/SalI⁻/BglIII⁺)及其选出的转版本 BamHI 消化物的预期杂交模式示于图 25 和 27。BamHI

消化物显示确有一个 2.5Kb 的 “BamHI³⁺” 转版本唯一的杂交片段。对 “BamHI³⁺/SalI⁺” 检测到另有 4.2Kb 的带,说明在这个转版本中 SalI 标记的扩增子如 DNA-旗模式所得结果预计的那样仍存在。转版本 “BamHI⁴⁺” 显示与 “BamHI³⁺” 转版本相同的杂交模式。原始亲代株黑曲霉 NP505-2 和两个亲代转版本菌株 BamHI²⁺/SalI⁺/BglIII⁻ 及 BamHI²⁺/SalI⁻/BglIII⁺ 的杂交模式的比较见前面各图。

上述菌株内 DNA 的 BglIII 消化物的预期杂交模式示于图 28。“BamHI³⁺” 和 “BamHI⁴⁺” 转版本中均可测出三条杂交带(145, 7.5 和 5.7), 强度均相同,说明除了 5'-和 3'-侧翼序列以外,还有 phyA 基因拷贝也分别增至 6 和 8。

对转版本 “BamHI³⁺/SalI⁺” 也观察到预期模式,它包含大小为 11.7Kb 的带(为 SalI 扩增子存在的特征)。此带的强度当然弱三倍。

这些结果清楚说明,可筛选得到包含 3、甚至 4 个 BamHI 标记的 glaA 扩增子、并均包含 2 个 phyA 盒的转版本。

1.6.d 摇瓶发酵分析肌醇六磷酸酶的产生

为确定所选 “BamHI³⁺” 和 “BamHI⁴⁺” 转版本是否显示确有肌醇六磷酸酶的产量增加,按材料与方法所述进行摇瓶发酵。亲代株 NP505-2(有 2 个 phyA 基因拷贝)的肌醇六磷酸酶表达水平测得平均约 200U/ml。三个选出的转版本的肌醇六磷酸酶水平测得 “BamHI³⁺/SalI⁺” 和 “BamHI³⁺” 转版本为约 600U, “BamHI⁴⁺” 转版本菌株为 800U/ml,与预期一样。

后来命名这些菌株分别为黑曲霉 NP505-6, -7, 和-8。

1.7. 直接选择肌醇六磷酸酶产量增加的重组体

1.7.a 原理说明

由于 glaA DNA 扩增子用所谓 “DNA-旗” 标记了,故可只用基于

PCR 的 DNA-旗检验选出转版本。应用这种遗传学筛选方法，我们能显示并证实 phyA 修饰的 BamHI 标记 glaA 扩增子和另两个扩增子之间的转变使 phyA 表达盒增加。

如上述，我们发现 phyA 基因拷贝数和肌醇六磷酸酶产量之间存在线性关系，这说明也可基于表达进行选择。本实施例中我们显示，通过在微孔板上，从最初 BamHI-glaA 打靶的 phyA 重组菌株的子代中筛选肌醇六磷酸酶表达量增加的子代，可分离到有增加的 phyA 基因拷贝数的转版本。

1.7.b 筛选增加的肌醇六磷酸酶表达水平

将黑曲霉 NP505-2 的单菌落的孢子接种于含 200 μ l 黑曲霉发酵培养基（如材料与方法所示）的 96 孔板中。34℃，100%湿度及轻微振荡的条件下生长 7 天后，测每孔上清中肌醇六磷酸酶活性，检验了近千个子代的酶表达水平。收获肌醇六磷酸酶活性增强的细胞，收集孢子并进行另一轮微滴定筛选。同样发现肌醇六磷酸酶活性增强的细胞。

在随后的摇瓶发酵中，这些鉴定出的菌株显示肌醇六磷酸酶表达水平高达 600U/ml。

1.7.c 鉴定出的重组菌株的遗传鉴定

所观察到的上述菌株肌醇六磷酸酶产量的增加似乎是 phyA 基因拷贝数通过含 phyA 的 BamHI 标记 glaA 位点的扩增或转变而增加的结果。首先，应用 DNA-旗检验，然后进行 Southern 分析，确定选出的这些菌株的基因型。

DNA-旗检验清楚地说明，选出的菌株囊括了所有各种“DNA-旗”基因型。这些菌株显示与以进行 DNA-旗检验为选择标准而分离出的菌株相同的基因型，象：

BamHI²⁺/Sal⁺/BglIII⁻, BamHI²⁺/Sal⁺/BglIII⁻,
BamHI³⁺/Sal⁺/BglIII⁻, BamHI²⁺/Sal⁻/BglIII⁺,
BamHI³⁺/Sal⁻/BglIII⁻.

所有这些基因型按前面实施例所述进行 Southern 分析确证。

青霉菌实施例

2.1 选择和鉴定产黄青霉宿主

2.1.a 原理说明

通过基因转变而扩增插入的基因要求基因组中有多个同源 DNA 区。产黄青霉的这些区已有描述(本报告中称为 PEN 扩增子: Fierro 等, 1995, 美国国家科学院院报, 92:6200-6204)。包含青霉素生物合成基因 *pcbAB*, *pcbC* 和 *penDE* 的一个 15Kb 青霉素簇区位于这些 PEN 扩增子上(图 29)(Diez 等 1990, 生物化学杂志, 265:16358-16365; Smith 等, 1990 EMBO. J. 9:741-747)。这里我们描述了对包含多拷贝 PEN 扩增子的产黄青霉宿主菌株 CBS649.97 的选择和鉴定。

2.1.b 定量 PEN 扩增子

用经典菌株改良法, 从包含单个 PEN 扩增子(Fierro 等, 1995, 美国国家科学院院报, 92:6200-6204)的 Wis 54-1255(ATCC 28089)菌株获得产黄青霉株 CBS 649.97。CBS649.97 中的 PEN 扩增子数经 Southern 分析确定。为此, 用 BstXI 消化染色体 DNA, 并与 HELE 和 *niaD* 探针杂交。测得 CBS649.97 与 HELE/*niaD* 杂交比 Wis 54-1255 高 7 倍(图 30, 42)。相似地, NotI 消化的 DNA 经 CHEF 分离后, 与 HELE 探针杂交(图 42)。在 CBS649.97 中检测到的一个主要杂交信号比在 Wis54-1544 中检测到的要大约 420Kb (图 31)。这些结果说明 CBS649.97 中有约 7 个 PEN 扩增子。

2.2 构建表达载体

2.2.a 原理说明

rDNA 分子定向插入(打靶到)基因组中通过同源重组进行。故, rDNA 盒应在其侧翼有同源于基因组中靶位点的 DNA 片段(图 32)。青霉素簇

中定为 HELE 和 HELF 的两个定向区被选出,用于将表达盒定向插入 PEN 扩增子中(图 29)。这里我们描述用于本报告的 amdS, cefE 和 cefF 表达载体的设计和构建。

2.2.b 表达载体的基本设计

向基因组中定向整合要求必须是线性 DNA 分子,且 5' 和 3' 末端(侧翼)必须由同源于所预期整合的位点的 DNA 组成。故转化片段包含 5' 和 3' 侧有定向区的表达盒(目的基因受适当启动子和终止子调节)。将这些片段克隆进入用于质粒增殖的大肠杆菌载体中。所得表达载体均设计为大肠杆菌序列在转化片段的线性化和分离过程中会被去除(图 32)。因此,重组菌株将不含大肠杆菌 DNA(E. P. O 635 574 A1)。

2.2.c 表达载体 pHELE-A1 的构建

用寡核苷酸 1 和 2 从产黄青霉株 649.97 的染色体 DNA 中 PCR 扩增 5' HELE 打靶区。所得产物作为 NotI-SpHI 片段克隆至 pZerO™-1(Invitrogen, Carlsbad, USA)中,产生质粒 pHELE5'。相似地,3' HELE 打靶区用寡核苷酸 3 和 4 经 PCR 扩增而得,并作为 HindIII-NotI 片段克隆进 pHELE5' 中,从而产生质粒 pHELF53。包含受 P_{gpdA} 和 T_{amdS} 调节的 amdS 的表达盒从质粒 pGBDEL4L(E. P. O 635 547 A1)中用寡核苷酸 5 和 6 经 PCR 进行扩增。所得产物作为 NotI 片段克隆进 pHELE53 中,产生表达载体 pHELE-A1(图 33)。

2.2.d 表达载体 pHELF-A1 的构建

5' HELF 打靶区用寡核苷酸 7 和 8 从产黄青霉株 CBS649.97 的染色体 DNA 中经 PCR 而扩增。所得产物作为 NotI-XbaI 片段克隆进 pZerO™-1(Invitrogen, Carlsbad, USA)中,产生质粒 pHELF5'。相似地,3' HELF 侧翼用寡核苷酸 9 和 10 经 PCR 而扩增,并作为 PstI-NotI 片段克隆进 pHELF5' 中,产生 pHELF53。包含受 P_{gpdA} 和 T_{amdS} 调节的 amdS 的表达盒用寡核苷酸 5 和 6 从质粒 pGBDEL4L(E. P. O 635 547 A1)中

经 PCR 而扩增。所得产物作为 NotI 片段克隆至 pHELF53 中, 产生表达载体 pHELF-A1 (图 34)。

2.2.e 表达载体 pHELE-E1 的构建

P_{pcbC} 用寡核苷酸 11 和 12 从产黄青霉菌株 CBS649.97 的基因组 DNA 中经 PCR 而扩增。所得产物作为 XhoI-NdeI 片段克隆至 pGSEWA(WO 95/04148) 中, 产生 pISEWA-N。最后, 受 P_{pcbC} 和 T_{penDE} 调节的 *cefE* 表达盒从 pISEWA-N 中作为 NotI 片段克隆至 pHELE53 中, 产生表达载体 pHELE-E1 (图 35)。

2.2.f 表达载体 pHELF-F1 的构建

cefF 基因用寡核苷酸 13 和 14, 从带小棒链霉菌 ATCC 27064 的基因组 DNA 中经 PCR 扩增, PCR 依照 Expand™ Long Template PCR System (Boehringer Mannheim) 进行。循环条件为: 30x(1min 98℃, 5min 70℃, 1x(7min 72℃)。所得产物作为 NdeI-NsiI 片段克隆至 pISEWA-N 中 (取代 *cefE*), 产生 pISFWA。最后, 受 P_{pcbC} 和 T_{penDE} 调节的 *cefF* 表达盒从 pISFWA 中作为 NotI 片段克隆至 pHELF53 中, 产生表达载体 pHELF-F1 (图 36)。

2.3 用 *cefE* 修饰 PEN 扩增子

2.3.a 原理说明

转化体的有效选择要求有一个可选择标记。真菌的共转化过程为人熟知, 是宿主同时用两种不同的 rDNA 分子转化; 其一包含目的基因而另一包含选择标记。双向选择性 *amdS* 标记的应用允许反复转化产黄青霉宿主 (E. P. O 635 547 A1)。因打靶整合而产生的直接重复序列之间的重组将导致 *amdS* 盒的丢失, 并可在氟乙酰胺培养基上选择 (图 37)。这里我们描述了对含有整合于其中一个 PEN 扩增子的 *cefE* 表达盒的无 *amdS* 重组体进行选择。

2.3.b 定向的 amdS, cefE 共转化体的选择。

产黄青霉菌 CBS649.97 用 SfiI 线性化的 HELE-A1 和 HELE-E1 片段共转染(图 33, 35)。含 amdS 的转化体从乙酰胺平板上选出, 并用寡核苷酸 17 和 18 经盒式 PCR 检验有无 cefE(图 40a)。用寡核苷酸 19, 20 和 21 经定向 PCR 鉴别有 amdS 或 cefE 整合在 HELE 中的共转化体(图 40.b, c)。这些菌株用于分离 amdS⁻重组体。

2.3.c amdS⁻(无标记)cefE 重组体的选择

将 2.3.b 所述 amdS, cefE 共转染体的孢子铺板于氟乙酰胺培养基上。保留 cefE 的重组体经大肠杆菌生物物质分析而鉴别。失去 amdS 但有至少一个 cefE 拷贝的情况用寡核苷酸 15, 16, 17 和 18 经盒式 PCR 证实(图 40. a, d)。选出这些菌株作 Southern 分析。

2.3.d amdS⁻重组体的 Southern 分析

cefE 向 HELE 中的整合及 cefE 在 amdS⁻、cefE⁺重组体中的拷贝数用 Southern 和 TAFE 分析。为此, 重组体的染色体 DNA 经 NruI 消化再与 cefE 探针杂交(图 38, 42)。对经 TAFE 分离的 HpaI 消化 DNA 进行相似的杂交过程(图 39), 选出有 cefE 整合进 HELE 中所预期的杂交模式的重组菌株以进行下一步实验。

2.4 用 amdS 修饰第二扩增子

2.4.a 原理说明

基因转变实质上将受体 DNA 链的遗传信息用供体 DNA 链的来取代。供体链和受体链均可被标记以显示这一事件。2.3 所述的菌株已有一个扩增子被 cefE 标记(本例中为供体链)。这里我们描述通过向不同于 cefE 所在区的另一个 PEN 扩增子中插入一个 amdS 盒而修饰受体链(图 43)。

2.4.b amdS 定向于第二 PEN 扩增子。

2.3.d 所述包含一个带 *cefE* 的扩增子的菌株用 *SfiI* 线性化的 HELE-A1 片段(图 33)转化。*amdS* 的整合及向 HELE 的定向分别用寡核苷酸 15, 16 及 19, 20 经盒式 PCR 及定向 PCR 检验(图 40, c, d)。*amdS* 整合在 *cefE* 的邻位或多个 *amdS* 拷贝整合在一个 HELE 位点均可用寡核苷酸 20, 21, 22 和 23 经定向 PCR 鉴别(图 40e, f, g), 从而选出有单一 *amdS* 盒整合在第二扩增子中的菌株, 进行 Southern 分析。

2.4.c *amdS* 转化体的 Southern 分析。

2.4.b 所述转化体的染色体 DNA 经 *HpaI* 消化后与 *amdS* 探针杂交(图 41, 42)。选出有 *amdS* 正确整合在 HELE 中所预期的杂交模式的菌株, 进行基因转变实验。

2.5 通过基因转变增加产量。

2.5.a 原理说明

整合基因的拷贝数可通过基因转变增加(图 43)。结果该基因编码的酶的产量或酶催化活性增加。表达 *cefE* 的产黄青霉重组体在合适条件下发酵时可产生己二酰-7-ADCA(Crawford 等, 1995, *BIOTechnol.* 13:58-62)。这里我们描述对 *cefE* 基因转版本的选择和鉴定, 以及由此导致的己二酰-7-ADCA 产量的增加。

2.5.b *cefE* 基因转版本的选择。

将 2.5.a 所述在不同 PEN 扩增子中含有 *cefE* 和 *amdS* 的菌株的孢子铺板于氟乙酰胺培养基上, 以便选择 *amdS*⁻ 重组体。这些重组体的 *amdS*⁻、*cefE*⁺ 基因型用寡核苷酸 15, 16, 17, 18, 26 和 27 经盒式 PCR 证实(图 40a, d, h)。用寡核苷酸 26 和 27 可扩增唯一 *niaD* 位点的片段, 该片段可作为 PCR 产物相对定量的内部参照。通过相比于亲代株其 *cefE*/*niaD* 比率增高而由此鉴定为失去了 *amdS* 标记但获得了 *cefE* 多拷贝的基因转版本菌株被选出进行 Southern 分析。

2.5.c cefE 基因转版本的 Southern 分析。

2.5.b 选出的菌株的染色体 DNA 用 NruI 消化, 再与 cefE 和 niaD 探针杂交。具有与亲代株相同的杂交模式, 但 cefE/niaD 杂交信号的比率增大的菌株被选出进行己二酰-7-ADCA 发酵(图 48)。

2.5.d cefE 基因转版本的己二酰-7-ADCA 生产

2.7.b 选出的基因转版本的己二酰-7-ADCA 产量经摇瓶发酵测定。所有选出的菌株生产的己二酰-7-ADCA 比其对应的亲代株明显更多。

2.6 通过基因转变使不同表达盒同时增加

2.6.a 原理说明

包含大节段扩增子或甚至延伸至扩增子边界的区域可参与基因转变。从而相邻的不同基因的拷贝数可通过基因转变同时增加。表达 cefE 和 cefF 的产黄青霉重组体菌株在合适条件下发酵时可产生己二酰-7-ADAC(Crawford 等, 1995 BIO/Technol, 13:58-62)。这里我们描述打靶到同一 PEN 扩增子上不同位点的 cefE 和 cefF 表达盒(cefE+cefF)的同时基因转变, 及由此导致的己二酰-7-ADAC 产量的增加。

2.6.b (cefE+cefF) 转化体的选择

2.3.d 所述有 cefE 整合在 HELE 中的菌株用 SfiI 线性化的 HELF-A1 和 HELF-F1 片段(图 34, 36)共转化。转化体在乙酰胺平板上选出并用寡核苷酸 15, 16, 17 和 25 经盒式 PCR 检验 cefF 和 amdS(图 40d, j)。amdS 或 cefE 向 HELF 中的整合用寡核苷酸 20, 21 和 24 经定向 PCR 确定(图 40j, k)。这些菌株的染色体 DNA 用 NotI 消化, 印迹, 再用 HELE 探针杂交(图 44)。所含杂交片段相应于 cefF 或 amdS 向已含 cefE 的 PEN 扩增子上 HELF 中的整合的菌株被用于选择无标记基因型(amdS⁻)重组体。

2.6.c 无标记基因型(cefE+cefF)重组体的选择

将 2.6.b 所述菌株的孢子铺板于氯乙酰胺培养基上,以选择 amdS⁻重组体。失去 amdS 但保留 cefE 和 cefF 的重组体用寡核苷酸 15, 16, 17, 18 和 25 经盒式 PCR 鉴别(图 40a, d, j)。这些菌株的染色体用 NruI 消化, 再与 cefF 探针杂交(图 42, 45)。利用其 cefF 正确整合于 HELF 中的菌株筛选基因转版本。

2.6.d (cefE+cefF)基因转版本的选择

使 2.6.c 所述菌株的孢子长成单菌落, 然后用寡核苷酸 17, 18, 25, 26 和 27 经盒式 PCR 分析 cefE, cefF 和 niaD 的量(图 40a, h, i)。基因转版本为相比于亲代株其 cefE/niaD 和 cefF/niaD 比率同时增加了的菌株。cefE 和 cefF 增加的拷贝数用 Southern 分析证实。为此, 将染色体 DNA 用 NruI 消化再与 cefE 和 niaD 的探针杂交(图 46)。除去印迹上的探针后与 cefF 和 niaD 探针杂交(图 47)。选出其 cefE/niaD 和 cefF/niaD 比率均比亲代株高的菌株进行己二酰-7-ADAC 生产分析。

2.6.e (cefE+cefF)基因转版本的己二酰-7-ADAC 生产

2.6.d 中选出的基因转版本的己二酰-7-ADAC 生产用摇瓶发酵测定。所有选出的菌株生产的己二酰-7-ADAC 量均比亲代株的多。

序列表

(1) 一般资料:

(i) 申请人

(A) 姓名: Gist-Brocades B.V.

(B) 街名: Wateringseweg 1

(C) 城市: Delft

(D) 州名: none

(E) 国家: Netherlands

(F) 邮编 (ZIP): 2600 MA

(G) 电话: +31(0)15-2799111

(H) 电传: +31(0)15-2793957

(ii) 发明题目: 基因转变作为工具用于构建重组工业化生物体

(iii) 序列数: 52

(iv) 计算机可读形式

(A) 介质类型: 软盘

(B) 计算机: IBM PC 可兼容机

(C) 操作系统: PC-DOS/MS-DOS

(D) 软件: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (EP0)

(2) SEQ ID NO:1 的资料:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 41 个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑构型: 线性

(ii) 分子类型: 其它核酸

(A) 描述: /desc= “寡核苷酸”

(iii) 假设: 是

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:1

GTAGCTGCGG CCGCCTCCGT CTTCACTTCT TCGCCCGCAC T
41

(2)SEQ ID NO:2 的资料:

(i)序列特征:

(A)长度: 48 个碱基对

(B)类型: 核酸

(C)链型: 单链

(D)拓扑构型: 线性

(ii)分子类型: 其它核酸

(A)描述: /desc= “寡核苷酸”

(iii)假设: 是

(xi)序列描述: SEQ ID NO:2

CAAAGGGCAT GCGGCCGTAT CGGCCGGTGA CAAACATCAT TCAACGCC
48

(2)SEQ ID NO:3 的资料:

(i)序列特征:

(A)长度: 42 个碱基对

(B)类型: 核酸

(C)链型: 单链

(D)拓扑构型: 线性

(ii)分子类型: 其它核酸

(A)描述: /desc= “寡核苷酸”

(iii)假设: 是

(xi)序列描述: SEQ ID NO:3

ATGTTTAAGC TTGGCCGATA CGGCCAAAAC ACCTTTGATT TC
42

(2)SEQ ID NO:4 的资料:

(i)序列特征:

(A)长度: 45 个碱基对

(B)类型: 核酸

(C)链型: 单链

(D)拓扑构型: 线性

(ii)分子类型: 其它核酸

(A)描述: /desc= “寡核苷酸”

(iii)假设: 是

(xi)序列描述: SEQ ID NO:4

CAAGTTGCGG CCGCTCCTCA CTAACGAGCC AGCAGATATC GATGG
45

(2)SEQ ID NO:5 的资料:

(i)序列特征:

(A)长度: 39 个碱基对

(B)类型: 核酸

(C)链型: 单链

(D)拓扑构型: 线性

(ii)分子类型: 其它核酸

(A)描述: /desc= “寡核苷酸”

(iii)假设: 是

(xi)序列描述: SEQ ID NO:5

AAGCTTATGC GGCCGCGAAT TCGAGCTCTG TACAGTGAC
39

(2)SEQ ID NO:6 的资料:

(i)序列特征:

(A)长度: 40 个碱基对

(B)类型: 核酸

(C)链型: 单链

(D)拓扑构型: 线性

(ii)分子类型: 其它核酸

(A)描述: /desc= “寡核苷酸”

(iii)假设: 是

(xi)序列描述: SEQ ID NO:6

(2)SEQ ID NO:6 的资料:

(i)序列特征:

(A)长度: 40 个碱基对

(B)类型: 核酸

(C)链型: 单链

(D)拓扑构型: 线性

(ii)分子类型: 其它核酸

(A)描述: /desc= “寡核苷酸”

(iii)假设: 是

(xi)序列描述: SEQ ID NO:6

CGGTACGTGC GGCCGCTCGT ACCATGGGTT GAGTGGTATG
40

(2)SEQ ID NO:7 的资料:

(i)序列特征:

(A)长度: 43 个碱基对

(B)类型: 核酸

(C)链型: 单链

(D)拓扑构型: 线性

(ii)分子类型: 其它核酸

(A)描述: /desc= “寡核苷酸”

(iii)假设: 是

(xi)序列描述: SEQ ID NO:7

ATATGTGCGG CCGCTTTACA TGGTCAATGC AATTAGATGG TGG
43

(2)SEQ ID NO:8 的资料:

(i)序列特征:

(A)长度: 47 个碱基对

(B)类型: 核酸

- (C)链型: 单链
- (D)拓扑构型: 线性
- (ii)分子类型: 其它核酸
 - (A)描述: /desc= “寡核苷酸”
- (iii)假设: 是
- (xi)序列描述: SEQ ID NO:8

ATAACTCTAG AGGCCCTACC GGCCTTTGCA AATATACTGT AAGAACC
47

(2)SEQ ID NO:9 的资料:

- (i)序列特征:
 - (A)长度: 43 个碱基对
 - (B)类型: 核酸
 - (C)链型: 单链
 - (D)拓扑构型: 线性
- (ii)分子类型: 其它核酸
 - (A)描述: /desc= “寡核苷酸”
- (iii)假设: 是
- (xi)序列描述: SEQ ID NO:9

GTATATTCTG CAGGGCCGGT AGGGCCAACA GTTTCCGCAG GTG
43

(2)SEQ ID NO:10 的资料:

- (i)序列特征:
 - (A)长度: 43 个碱基对
 - (B)类型: 核酸
 - (C)链型: 单链
 - (D)拓扑构型: 线性
- (ii)分子类型: 其它核酸
 - (A)描述: /desc= “寡核苷酸”
- (iii)假设: 是

(xi)序列描述: SEQ ID NO:10

GTATGGGCGG CCGCTTTACA ACTAGAATAT GGGAACCTGT GGG
43

(2)SEQ ID NO:11 的资料:

(i)序列特征:

(A)长度: 61 个碱基对

(B)类型: 核酸

(C)链型: 单链

(D)拓扑构型: 线性

(ii)分子类型: 其它核酸

(A)描述: /desc= “寡核苷酸”

(iii)假设: 是

(xi)序列描述: SEQ ID NO:11

CTCGAGTGCG GCCGCAAAGC TAGCTTGATA TCGAATTCTCT TATACTGGGC CTGCTGCATT
60

G
61

(2)SEQ ID NO:12 的资料:

(i)序列特征:

(A)长度: 45 个碱基对

(B)类型: 核酸

(C)链型: 单链

(D)拓扑构型: 线性

(ii)分子类型: 其它核酸

(A)描述: /desc= “寡核苷酸”

(iii)假设: 是

(xi)序列描述: SEQ ID NO:12

GTCCATATGG GTGTCTAGAA AAATAATGGT GAAAACTTGA AGGCG
45

(2)SEQ ID NO:13 的资料:

(i)序列特征:

- (A) 长度: 30 个碱基对
- (B) 类型: 核酸
- (C) 链型: 单链
- (D) 拓扑构型: 线性
- (ii) 分子类型: 其它核酸
 - (A) 描述: /desc= “寡核苷酸”
- (iii) 假设: 是
- (xi) 序列描述: SEQ ID NO:13

CATATGGCGG ACACGCCCGT ACCGATCTTC
30

(2) SEQ ID NO:14 的资料:

- (i) 序列特征:
 - (A) 长度: 54 个碱基对
 - (B) 类型: 核酸
 - (C) 链型: 单链
 - (D) 拓扑构型: 线性
- (ii) 分子类型: 其它核酸
 - (A) 描述: /desc= “寡核苷酸”
- (iii) 假设: 是
- (xi) 序列描述: SEQ ID NO:14

ATGCATTGGC TCGTCATGAA GAGCCTATCA TCCGGCCTGC GGCTCGTTCT TCGC
54

(2) SEQ ID NO:15 的资料:

- (i) 序列特征:
 - (A) 长度: 25 个碱基对
 - (B) 类型: 核酸
 - (C) 链型: 单链
 - (D) 拓扑构型: 线性
- (ii) 分子类型: 其它核酸

(A)描述: /desc= “寡核苷酸”

(iii)假设: 是

(xi)序列描述: SEQ ID NO:15

CAGCTACCCC GCTTGAGCAG ACATC
25

(2)SEQ ID NO:16 的资料:

(i)序列特征:

(A)长度: 25 个碱基对

(B)类型: 核酸

(C)链型: 单链

(D)拓扑构型: 线性

(ii)分子类型: 其它核酸

(A)描述: /desc= “寡核苷酸”

(iii)假设: 是

(xi)序列描述: SEQ ID NO:16

GTCAGGGAAG AACACGAGGG CGCAG
25

(2)SEQ ID NO:17 的资料:

(i)序列特征:

(A)长度: 25 个碱基对

(B)类型: 核酸

(C)链型: 单链

(D)拓扑构型: 线性

(ii)分子类型: 其它核酸

(A)描述: /desc= “寡核苷酸”

(iii)假设: 是

(xi)序列描述: SEQ ID NO:17

CCCTCTCTTC GTCGTTGTCC ACGCC
25

(2)SEQ ID NO:18 的资料:

(i)序列特征:

(A)长度: 25 个碱基对

(B)类型: 核酸

(C)链型: 单链

(D)拓扑构型: 线性

(ii)分子类型: 其它核酸

(A)描述: /desc= “寡核苷酸”

(iii)假设: 是

(xi)序列描述: SEQ ID NO:18

ATGTCCTTGG CCGACTTCAG CTCGG
25

(2)SEQ ID NO:19 的资料:

(i)序列特征:

(A)长度: 25 个碱基对

(B)类型: 核酸

(C)链型: 单链

(D)拓扑构型: 线性

(ii)分子类型: 其它核酸

(A)描述: /desc= “寡核苷酸”

(iii)假设: 是

(xi)序列描述: SEQ ID NO:19

GACGAGCCAA TGCATCTTTT GTATG
25

(2)SEQ ID NO:20 的资料:

(i)序列特征:

(A)长度: 25 个碱基对

(B)类型: 核酸

(C)链型: 单链

(D)拓扑构型: 线性

(ii)分子类型: 其它核酸

(A)描述: /desc= “寡核苷酸”

(iii)假设: 是

(xi)序列描述: SEQ ID NO:20

CGGGTACTCG CTCTACCTAC TTCGG
25

(2)SEQ ID NO:21 的资料:

(i)序列特征:

(A)长度: 27 个碱基对

(B)类型: 核酸

(C)链型: 单链

(D)拓扑构型: 线性

(ii)分子类型: 其它核酸

(A)描述: /desc= “寡核苷酸”

(iii)假设: 是

(xi)序列描述: SEQ ID NO:21

GCCCAAGTATA AGGAATTCGA TATCAAG
27

(2)SEQ ID NO:22 的资料:

(i)序列特征:

(A)长度: 25 个碱基对

(B)类型: 核酸

(C)链型: 单链

(D)拓扑构型: 线性

(ii)分子类型: 其它核酸

(A)描述: /desc= “寡核苷酸”

(iii)假设: 是

(xi)序列描述: SEQ ID NO:22

AGGGTCGACA CTAGTTCTAG AGCGG
25

(2)SEQ ID NO:23 的资料:

(i)序列特征:

(A)长度: 25 个碱基对

(B)类型: 核酸

(C)链型: 单链

(D)拓扑构型: 线性

(ii)分子类型: 其它核酸

(A)描述: /desc= “寡核苷酸”

(iii)假设: 是

(xi)序列描述: SEQ ID NO:23

GACGTTATCG GACGGAGACT CAGTG
25

(2)SEQ ID NO:24 的资料:

(i)序列特征:

(A)长度: 24 个碱基对

(B)类型: 核酸

(C)链型: 单链

(D)拓扑构型: 线性

(ii)分子类型: 其它核酸

(A)描述: /desc= “寡核苷酸”

(iii)假设: 是

(xi)序列描述: SEQ ID NO:24

GCCTACTCTG TTCTGGAGAG CTGC
24

(2)SEQ ID NO:25 的资料:

(i)序列特征:

(A)长度: 25 个碱基对

- (B)类型: 核酸
- (C)链型: 单链
- (D)拓扑构型: 线性
- (ii)分子类型: 其它核酸
- (A)描述: /desc= “寡核苷酸”
- (iii)假设: 是
- (xi)序列描述: SEQ ID NO:25

CCCCCATCCC GGTCACGCAC TCGCG
25

(2)SEQ ID NO:26 的资料:

- (i)序列特征:
 - (A)长度: 25 个碱基对
 - (B)类型: 核酸
 - (C)链型: 单链
 - (D)拓扑构型: 线性
- (ii)分子类型: 其它核酸
- (A)描述: /desc= “寡核苷酸”
- (iii)假设: 是
- (xi)序列描述: SEQ ID NO:26

CACAGAGAAT GTGCCGTTTC TTTGG
25

(2)SEQ ID NO:27 的资料:

- (i)序列特征:
 - (A)长度: 25 个碱基对
 - (B)类型: 核酸
 - (C)链型: 单链
 - (D)拓扑构型: 线性
- (ii)分子类型: 其它核酸
- (A)描述: /desc= “寡核苷酸”

(iii)假设: 是

(xi)序列描述: SEQ ID NO:27

TCACATATCC CCTACTCCCG AGCCG
25

(2)SEQ ID NO:28 的资料:

(i)序列特征:

(A)长度: 15 个碱基对

(B)类型: 核酸

(C)链型: 单链

(D)拓扑构型: 线性

(ii)分子类型: 其它核酸

(A)描述: /desc= “寡核苷酸”

(iii)假设: 是

(xi)序列描述: SEQ ID NO:28

GTCGCGTATC CCAGG
15

(2)SEQ ID NO:29 的资料:

(i)序列特征:

(A)长度: 18 个碱基对

(B)类型: 核酸

(C)链型: 单链

(D)拓扑构型: 线性

(ii)分子类型: 其它核酸

(A)描述: /desc= “寡核苷酸”

(iii)假设: 是

(xi)序列描述: SEQ ID NO:29

GTCAAAGGAT ATGCATAC
18

(2)SEQ ID NO:30 的资料:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 39 个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑构型: 线性

(ii) 分子类型: 其它核酸

(A) 描述: /desc= “寡核苷酸”

(iii) 假设: 是

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:30

AGCTTATGCG GCCGCGAATT CAGGTACCGT ATCTCGAGA
39

(2) SEQ ID NO:31 的资料:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 39 个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑构型: 线性

(ii) 分子类型: 其它核酸

(A) 描述: /desc= “寡核苷酸”

(iii) 假设: 是

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:31

AATTTCTCGA GATACGGTAC CTGAATTCGC GGCCGCATA
39

(2) SEQ ID NO:32 的资料:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 30 个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑构型: 线性

(ii)分子类型: 其它核酸

(A)描述: /desc= “寡核苷酸”

(iii)假设: 是

(xi)序列描述: SEQ ID NO:32

GTGCGAGGTA CCACAATCAA TCCATTTTCGC
30

(2)SEQ ID NO:33 的资料:

(i)序列特征:

(A)长度: 36 个碱基对

(B)类型: 核酸

(C)链型: 单链

(D)拓扑构型: 线性

(ii)分子类型: 其它核酸

(A)描述: /desc= “寡核苷酸”

(iii)假设: 是

(xi)序列描述: SEQ ID NO:33

ATGGTTCAAG AACTCGGTAG CCTTTTCCTT GATTCT
36

(2)SEQ ID NO:34 的资料:

(i)序列特征:

(A)长度: 36 个碱基对

(B)类型: 核酸

(C)链型: 单链

(D)拓扑构型: 线性

(ii)分子类型: 其它核酸

(A)描述: /desc= “寡核苷酸”

(iii)假设: 是

(xi)序列描述: SEQ ID NO:34

AGAATCAAGG AAAAGGCTAC CGAGTTCTTG AACCAT
36

(2)SEQ ID NO:35 的资料:

(i)序列特征:

(A)长度: 42 个碱基对

(B)类型: 核酸

(C)链型: 单链

(D)拓扑构型: 线性

(ii)分子类型: 其它核酸

(A)描述: /desc= “寡核苷酸”

(iii)假设: 是

(xi)序列描述: SEQ ID NO:35

ATCAATCAGA AGCTTTCTCT CGAGACGGGC ATCGGAGTCC CG
42

(2)SEQ ID NO:36 的资料:

(i)序列特征:

(A)长度: 21 个碱基对

(B)类型: 核酸

(C)链型: 单链

(D)拓扑构型: 线性

(ii)分子类型: 其它核酸

(A)描述: /desc= “寡核苷酸”

(iii)假设: 是

(xi)序列描述: SEQ ID NO:36

GACCATGATT ACGCCAAGCT T
21

(2)SEQ ID NO:37 的资料:

(i)序列特征:

(A)长度: 36 个碱基对

(B)类型: 核酸

- (C)链型: 单链
- (D)拓扑构型: 线性
- (ii)分子类型: 其它核酸
- (A)描述: /desc= “寡核苷酸”
- (iii)假设: 是
- (xi)序列描述: SEQ ID NO:37

GGATCCTTAA CTAGTTAAGT GGGGGCCTGC GCAAAG
36

(2)SEQ ID NO:38 的资料:

- (i)序列特征:
 - (A)长度: 36 个碱基对
 - (B)类型: 核酸
 - (C)链型: 单链
 - (D)拓扑构型: 线性
- (ii)分子类型: 其它核酸
- (A)描述: /desc= “寡核苷酸”
- (iii)假设: 是
- (xi)序列描述: SEQ ID NO:38

TTAACTAGTT AAGGATCCAC AATCAATCCA TTTCGC
36

(2)SEQ ID NO:39 的资料:

- (i)序列特征:
 - (A)长度: 34 个碱基对
 - (B)类型: 核酸
 - (C)链型: 单链
 - (D)拓扑构型: 线性
- (ii)分子类型: 其它核酸
- (A)描述: /desc= “寡核苷酸”
- (iii)假设: 是

(xi)序列描述: SEQ ID NO:39

GCTCTAGAGC GGCCGCGAAT TCATCCGGAG ATCC
34

(2)SEQ ID NO:40 的资料:

(i)序列特征:

(A)长度: 18 个碱基对

(B)类型: 核酸

(C)链型: 单链

(D)拓扑构型: 线性

(ii)分子类型: 其它核酸

(A)描述: /desc= “寡核苷酸”

(iii)假设: 是

(xi)序列描述: SEQ ID NO:40

CTTTGCGCAG GCCCCAC
18

(2)SEQ ID NO:41 的资料:

(i)序列特征:

(A)长度: 18 个碱基对

(B)类型: 核酸

(C)链型: 单链

(D)拓扑构型: 线性

(ii)分子类型: 其它核酸

(A)描述: /desc= “寡核苷酸”

(iii)假设: 是

(xi)序列描述: SEQ ID NO:41

TGCAGGGTAA ATCAGGGA
18

(2)SEQ ID NO:42 的资料:

(i)序列特征:

- (A)长度: 19 个碱基对
- (B)类型: 核酸
- (C)链型: 单链
- (D)拓扑构型: 线性
- (ii)分子类型: 其它核酸
 - (A)描述: /desc= “寡核苷酸”
- (iii)假设: 是
- (xi)序列描述: SEQ ID NO:42

TCCGCTAAAG GTGGTCGCG
19

(2)SEQ ID NO:43 的资料:

- (i)序列特征:
 - (A)长度: 20 个碱基对
 - (B)类型: 核酸
 - (C)链型: 单链
 - (D)拓扑构型: 线性
- (ii)分子类型: 其它核酸
 - (A)描述: /desc= “寡核苷酸”
- (iii)假设: 是
- (xi)序列描述: SEQ ID NO:43

CCCCAGCATC ATTACACCTC
20

(2)SEQ ID NO:44 的资料:

- (i)序列特征:
 - (A)长度: 20 个碱基对
 - (B)类型: 核酸
 - (C)链型: 单链
 - (D)拓扑构型: 线性
- (ii)分子类型: 其它核酸

(A)描述: /desc= “寡核苷酸”

(iii)假设: 是

(xi)序列描述: SEQ ID NO:44

AAAGGACCCG AGATCCGTAC
20

(2)SEQ ID NO:45 的资料:

(i)序列特征:

(A)长度: 25 个碱基对

(B)类型: 核酸

(C)链型: 单链

(D)拓扑构型: 线性

(ii)分子类型: 其它核酸

(A)描述: /desc= “寡核苷酸”

(iii)假设: 是

(xi)序列描述: SEQ ID NO:45

TCTCGATACC AAGGTCACCA CGGGC
25

(2)SEQ ID NO:46 的资料:

(i)序列特征:

(A)长度: 25 个碱基对

(B)类型: 核酸

(C)链型: 单链

(D)拓扑构型: 线性

(ii)分子类型: 其它核酸

(A)描述: /desc= “寡核苷酸”

(iii)假设: 是

(xi)序列描述: SEQ ID NO:46

GCATCCATCG GCCACCGTCA TTGGA
25

(2)SEQ ID NO:47 的资料:

(i)序列特征:

(A)长度: 25 个碱基对

(B)类型: 核酸

(C)链型: 单链

(D)拓扑构型: 线性

(ii)分子类型: 其它核酸

(A)描述: /desc= “寡核苷酸”

(iii)假设: 是

(xi)序列描述: SEQ ID NO:47

ATCCAGACCA GCACAGGCAG CTTCG
25

(2)SEQ ID NO:48 的资料:

(i)序列特征:

(A)长度: 25 个碱基对

(B)类型: 核酸

(C)链型: 单链

(D)拓扑构型: 线性

(ii)分子类型: 其它核酸

(A)描述: /desc= “寡核苷酸”

(iii)假设: 是

(xi)序列描述: SEQ ID NO:48

TCCGCATGCC AGAAAGAGTC ACCGG
25

(2)SEQ ID NO:49 的资料:

(i)序列特征:

(A)长度: 36 个碱基对

(B)类型: 核酸

(C)链型: 单链

(D)拓扑构型: 线性

(ii)分子类型: 其它核酸

(A)描述: /desc= “寡核苷酸”

(iii)假设: 是

(xi)序列描述: SEQ ID NO:49

GTCGACTTAA CTAGTTAAGG CTTGAGACGC AGCGAG
36

(2)SEQ ID NO:50 的资料:

(i)序列特征:

(A)长度: 36 个碱基对

(B)类型: 核酸

(C)链型: 单链

(D)拓扑构型: 线性

(ii)分子类型: 其它核酸

(A)描述: /desc= “寡核苷酸”

(iii)假设: 是

(xi)序列描述: SEQ ID NO:50

TTAACTAGTT AAGTCGACAC AATCAATCCA TTTCGC
36

(2)SEQ ID NO:51 的资料:

(i)序列特征:

(A)长度: 36 个碱基对

(B)类型: 核酸

(C)链型: 单链

(D)拓扑构型: 线性

(ii)分子类型: 其它核酸

(A)描述: /desc= “寡核苷酸”

(iii)假设: 是

(xi)序列描述: SEQ ID NO:51

AGATCTTTAA CTAGTTAAGT GGCCTGAACA GTGCCG
36

(2) SEQ ID NO:52 的资料:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 36 个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑构型: 线性

(ii) 分子类型: 其它核酸

(A) 描述: /desc= “寡核苷酸”

(iii) 假设: 是

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:52

TTAACTAGTT AAAGATCTAC AATCAATCCA TTTCGC
36

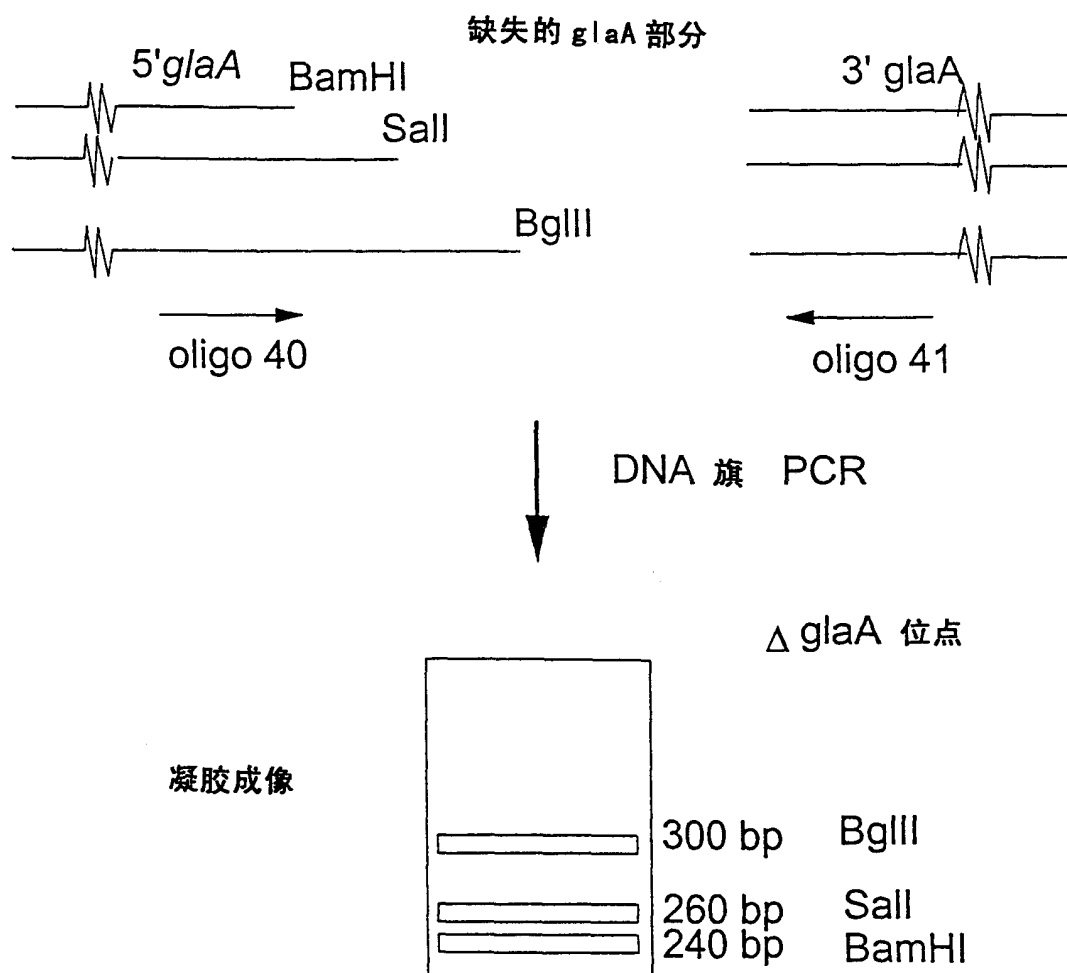
黑曲霉 ISO-505 的 $\Delta glaA$ 位点的显示

图 1

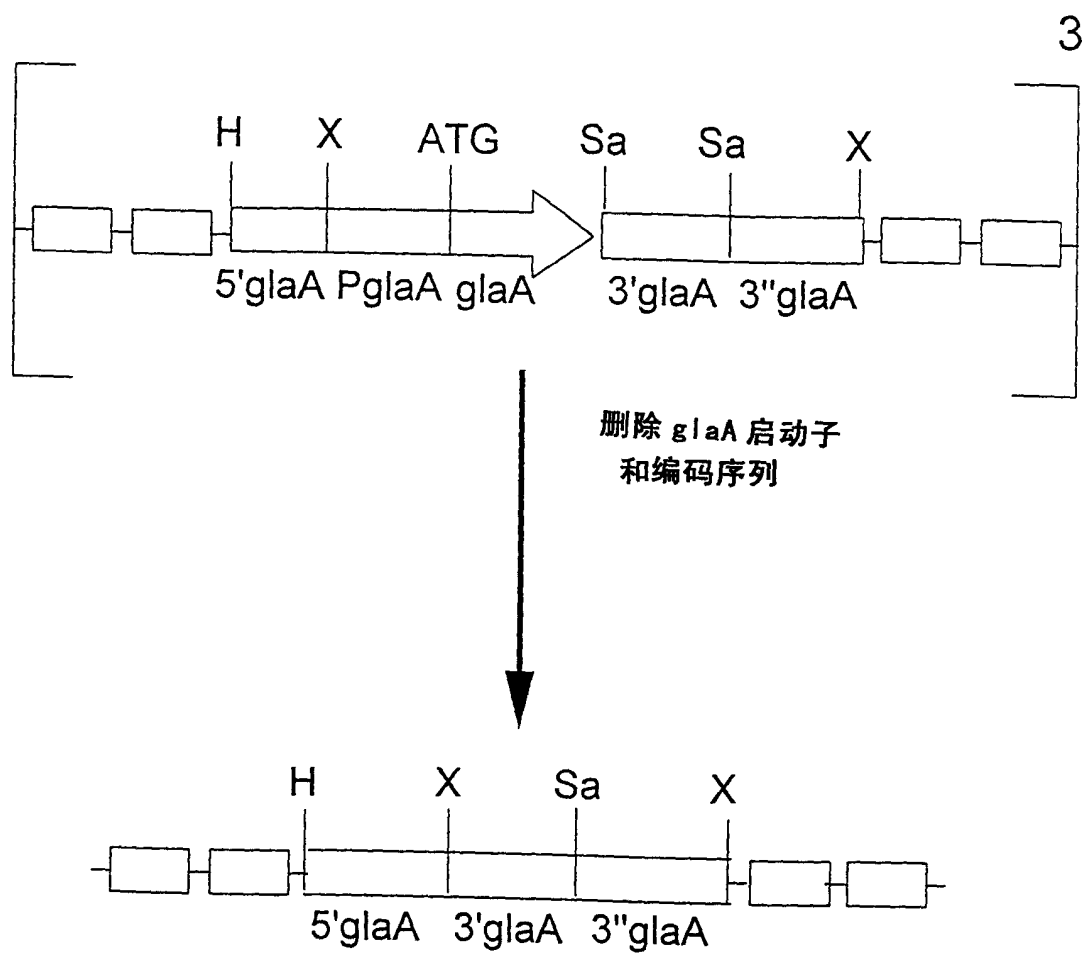


图 2

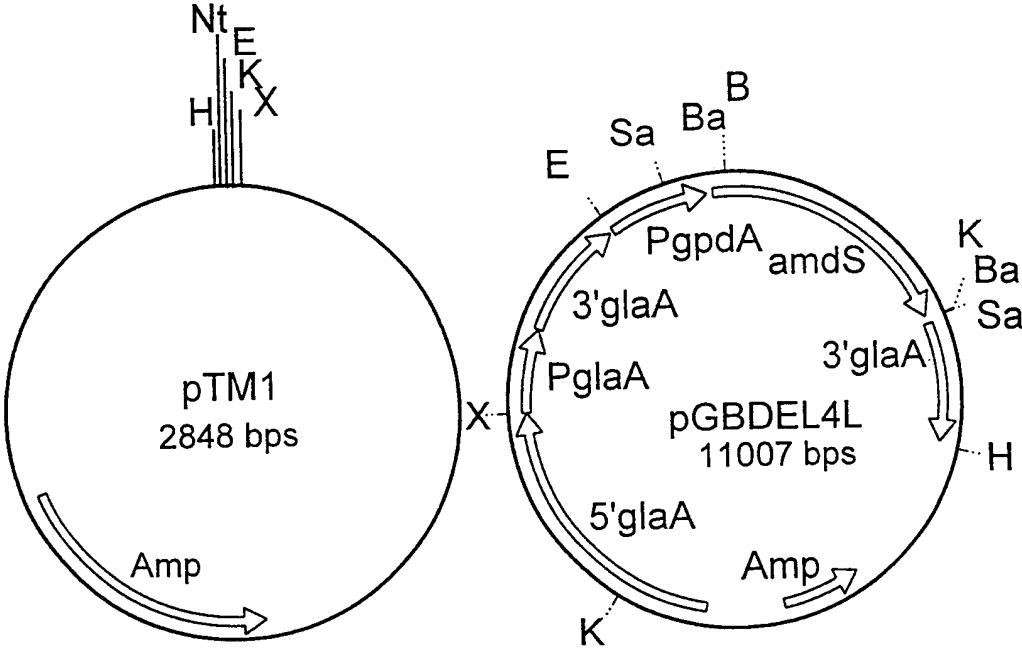


图 3a

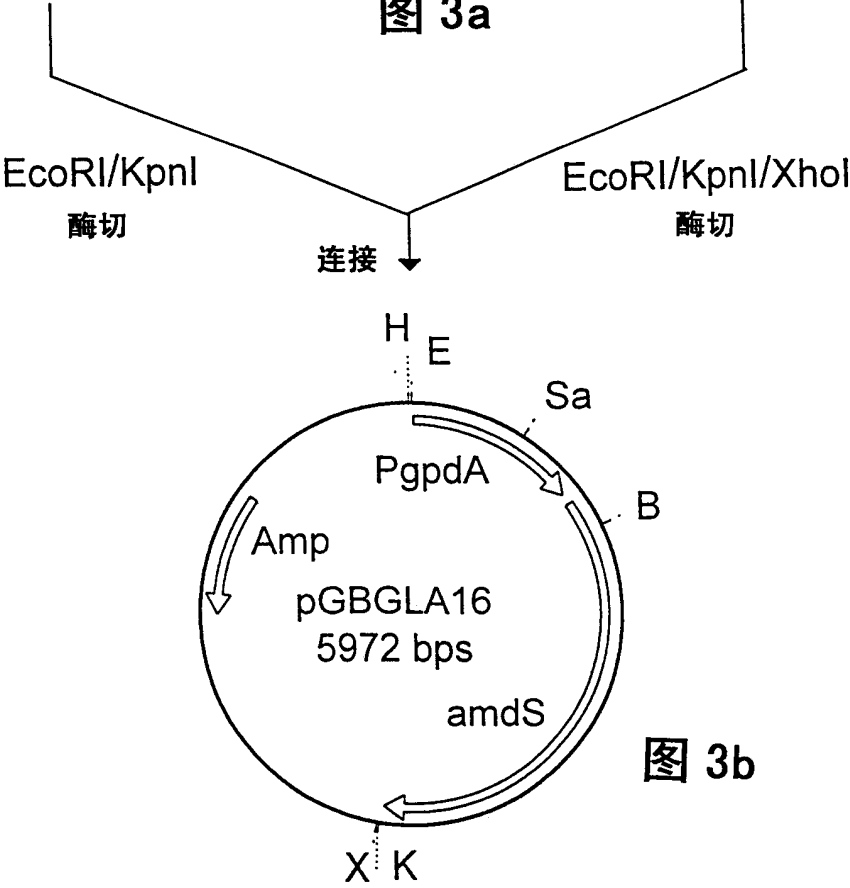


图 3b

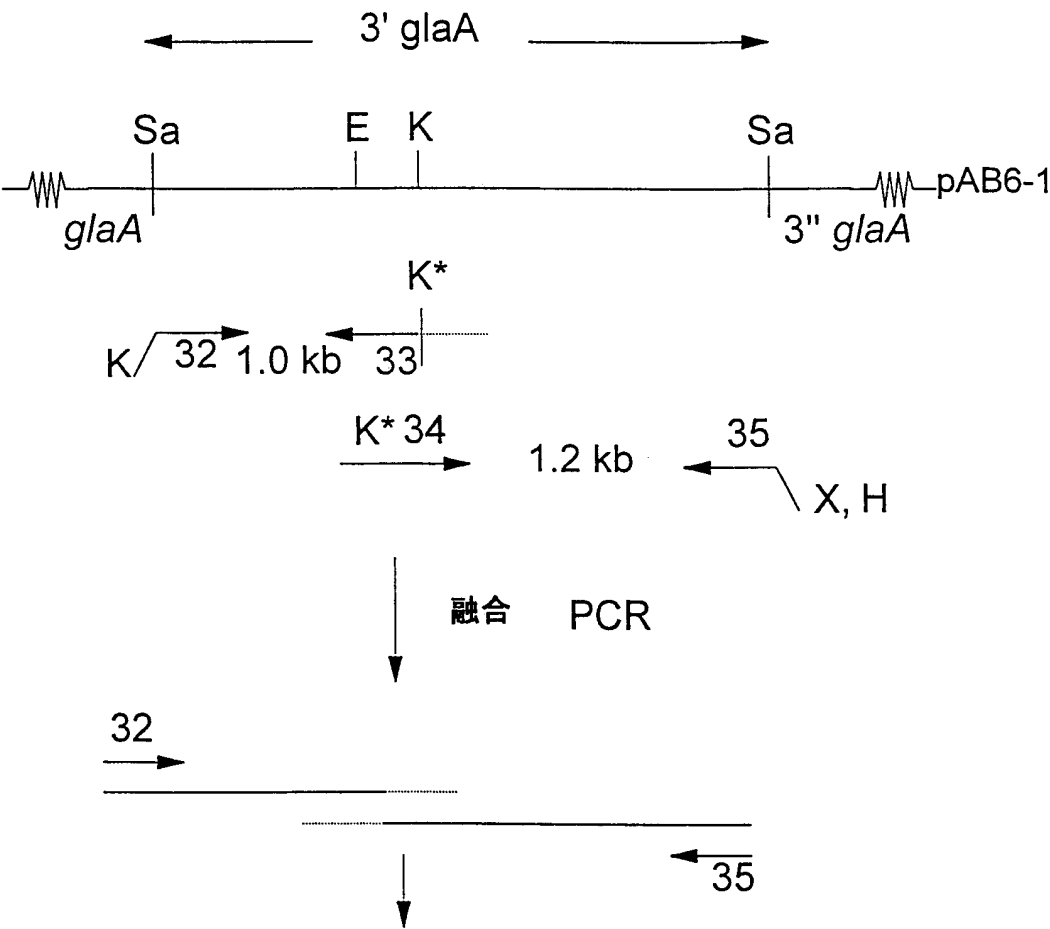


图 4a

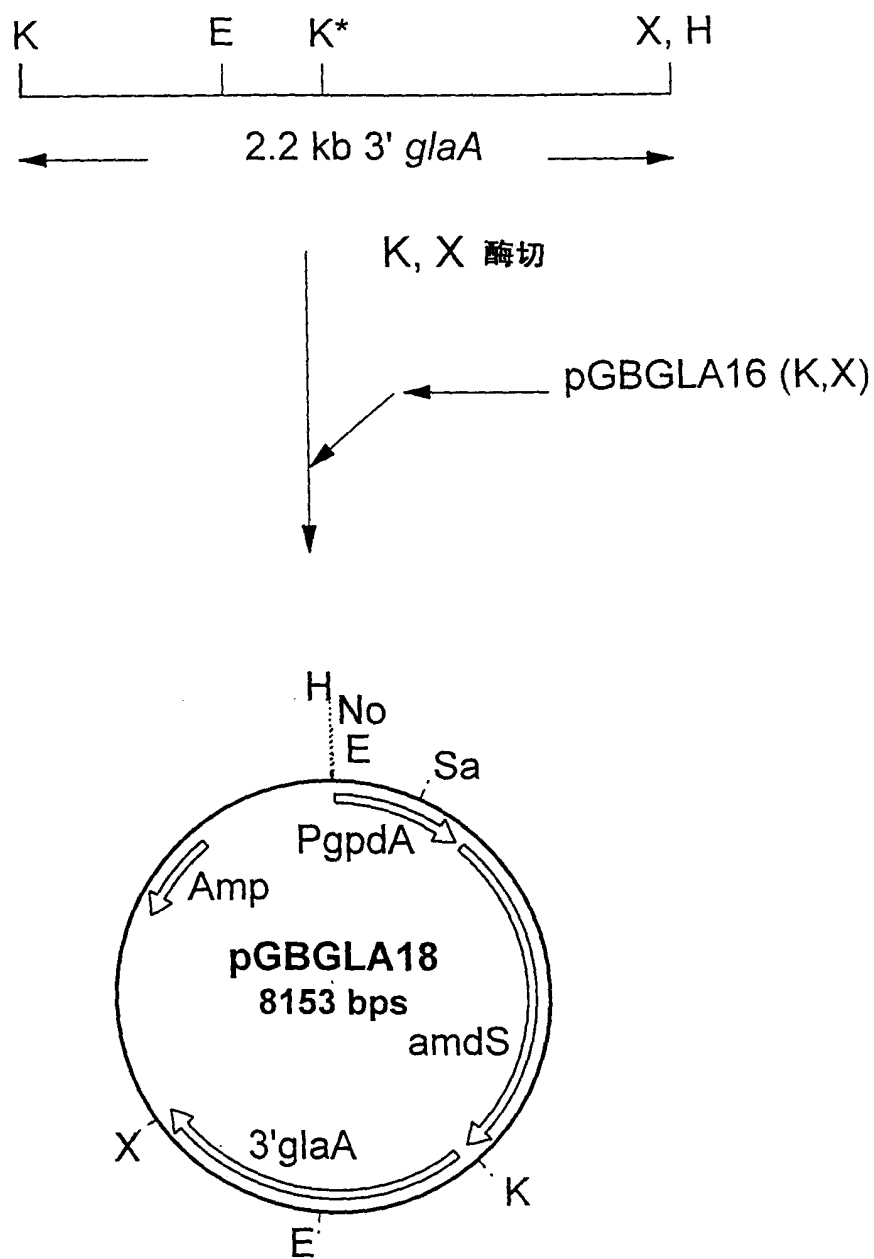


图 4b

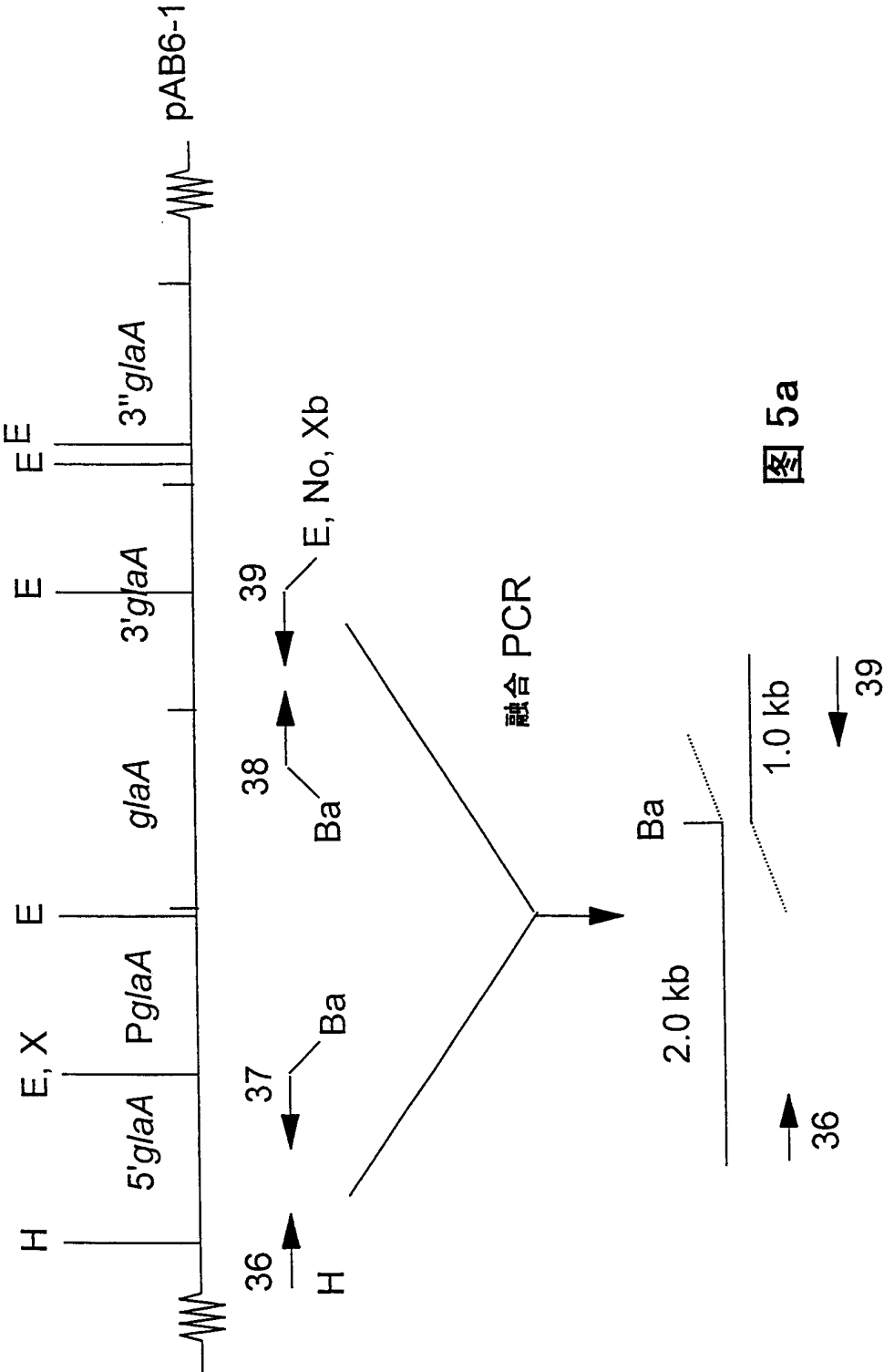


图 5a

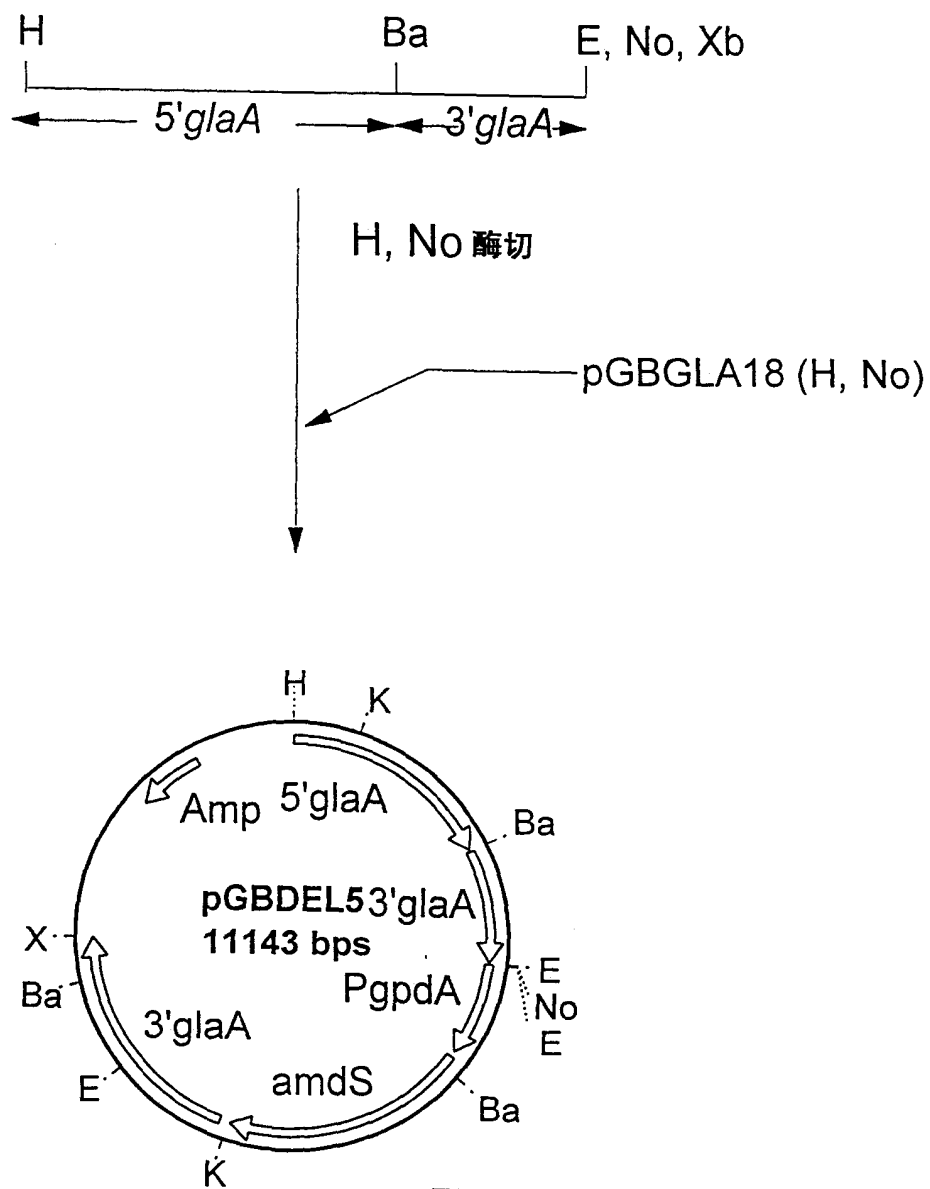


图 5b

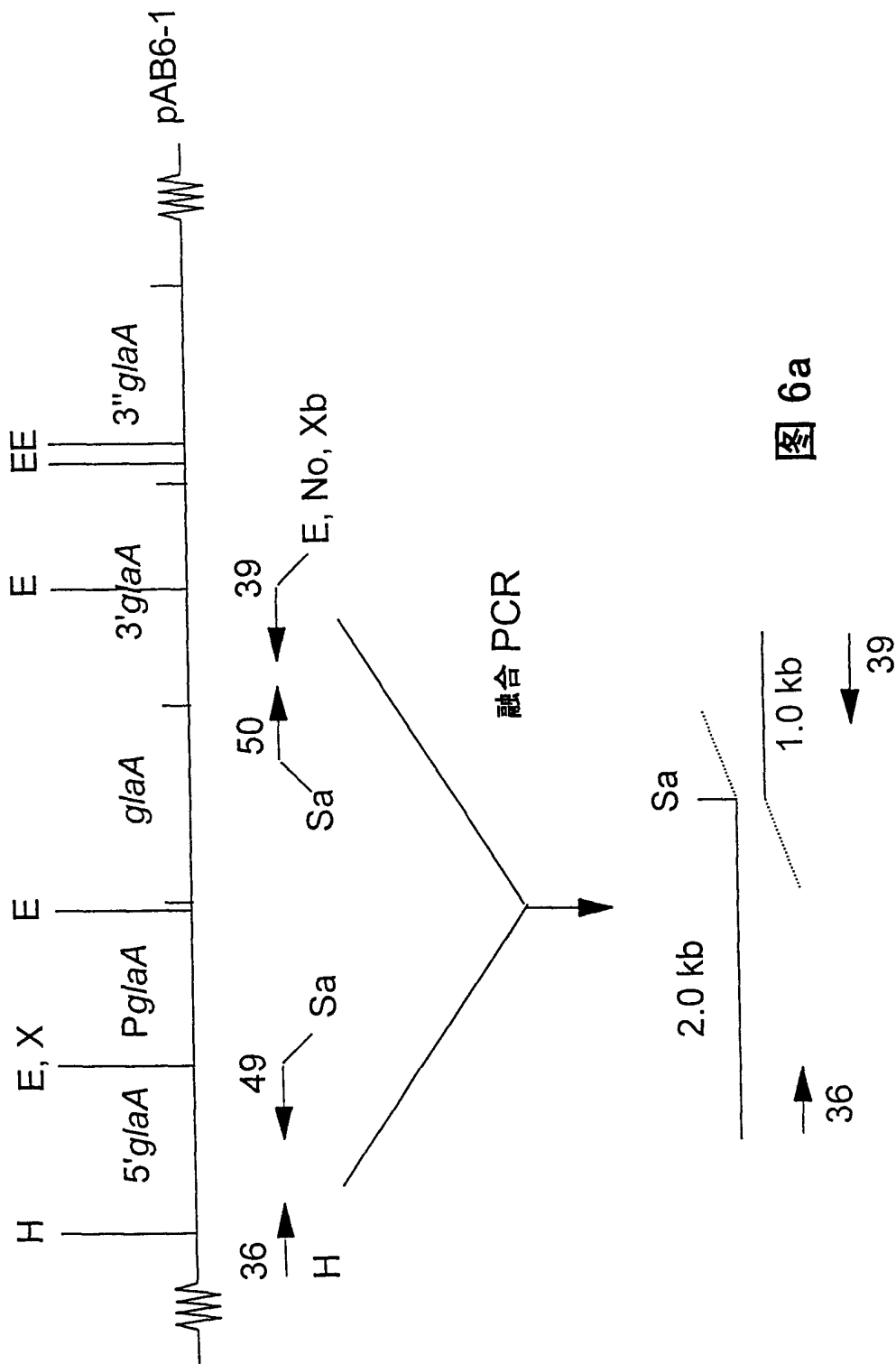


图 6a

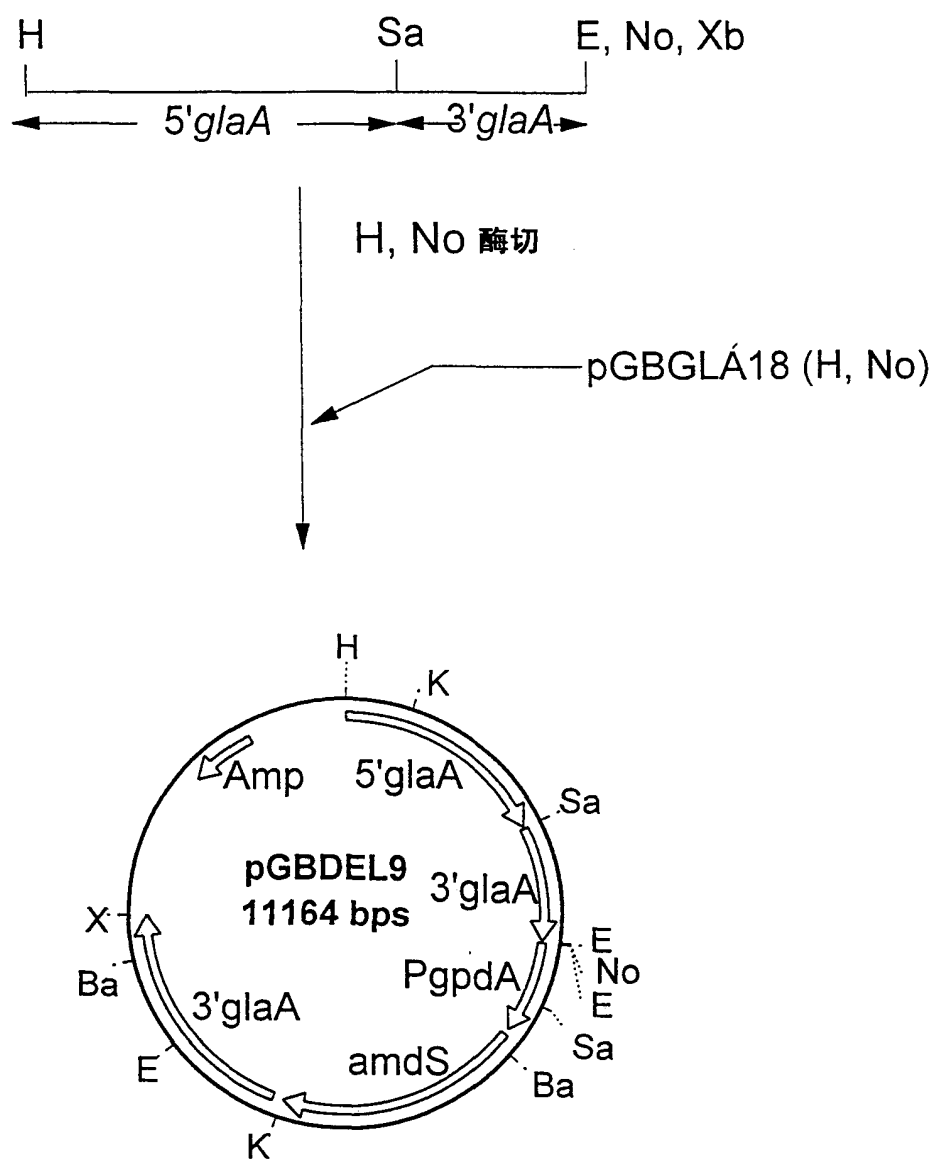


图 6b

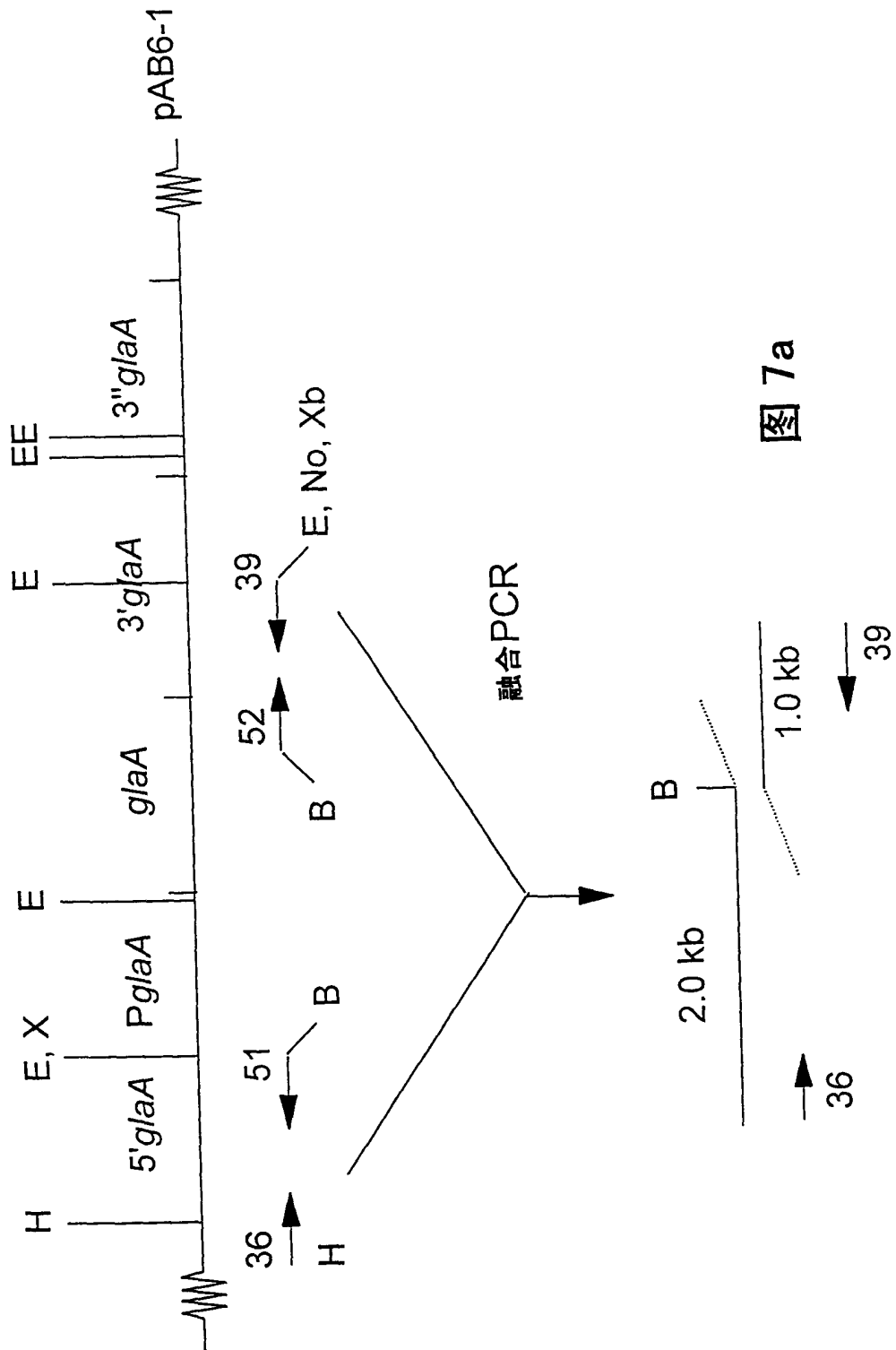


图 7a

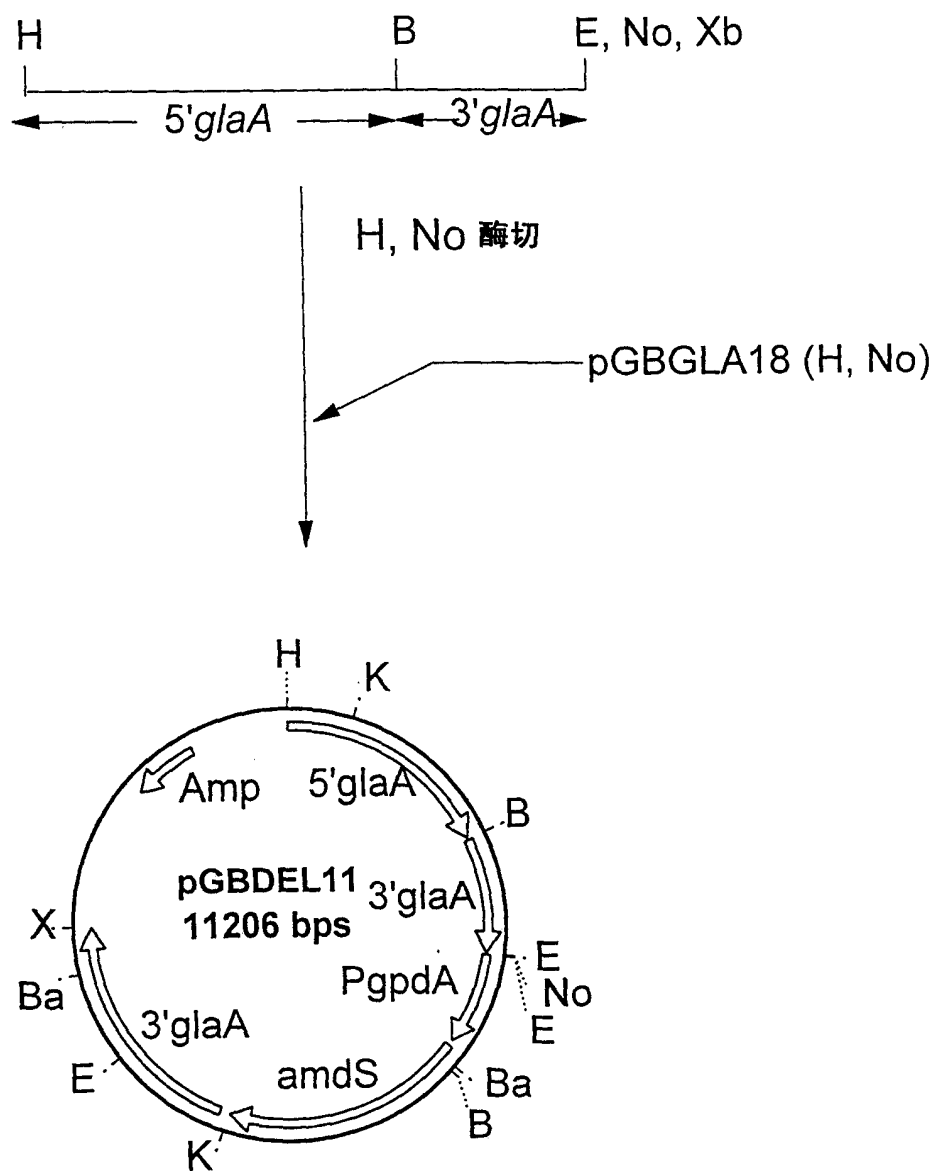


图 7b

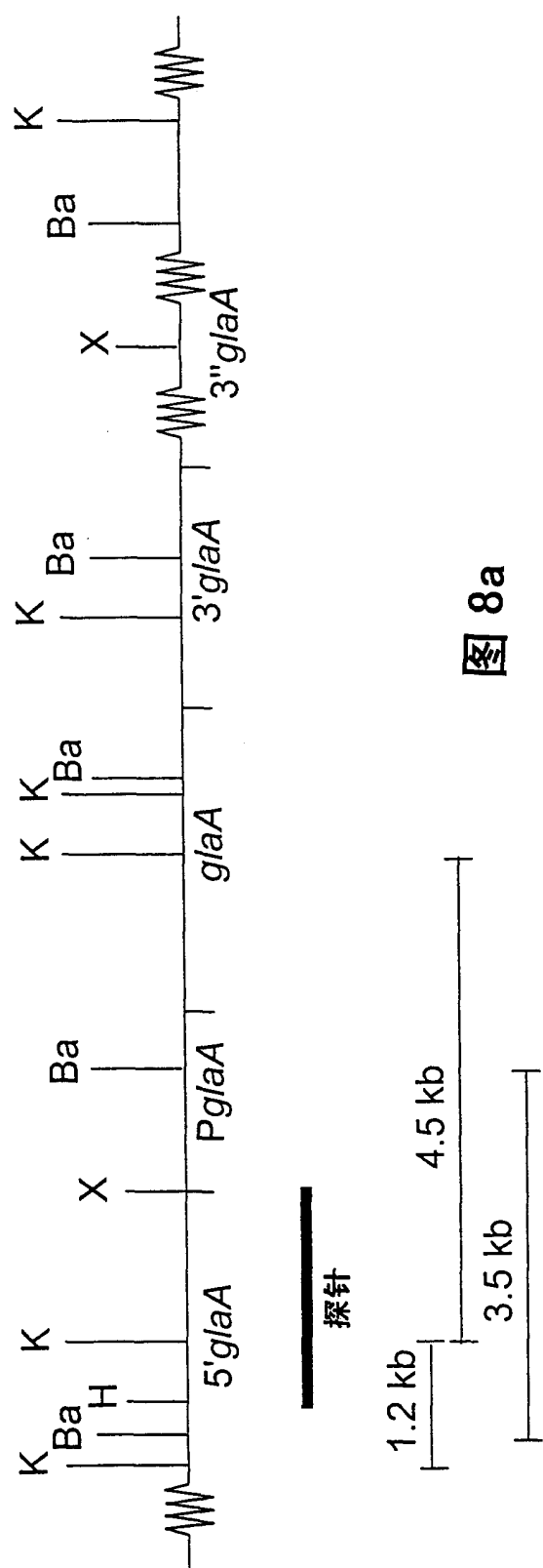


图 8a

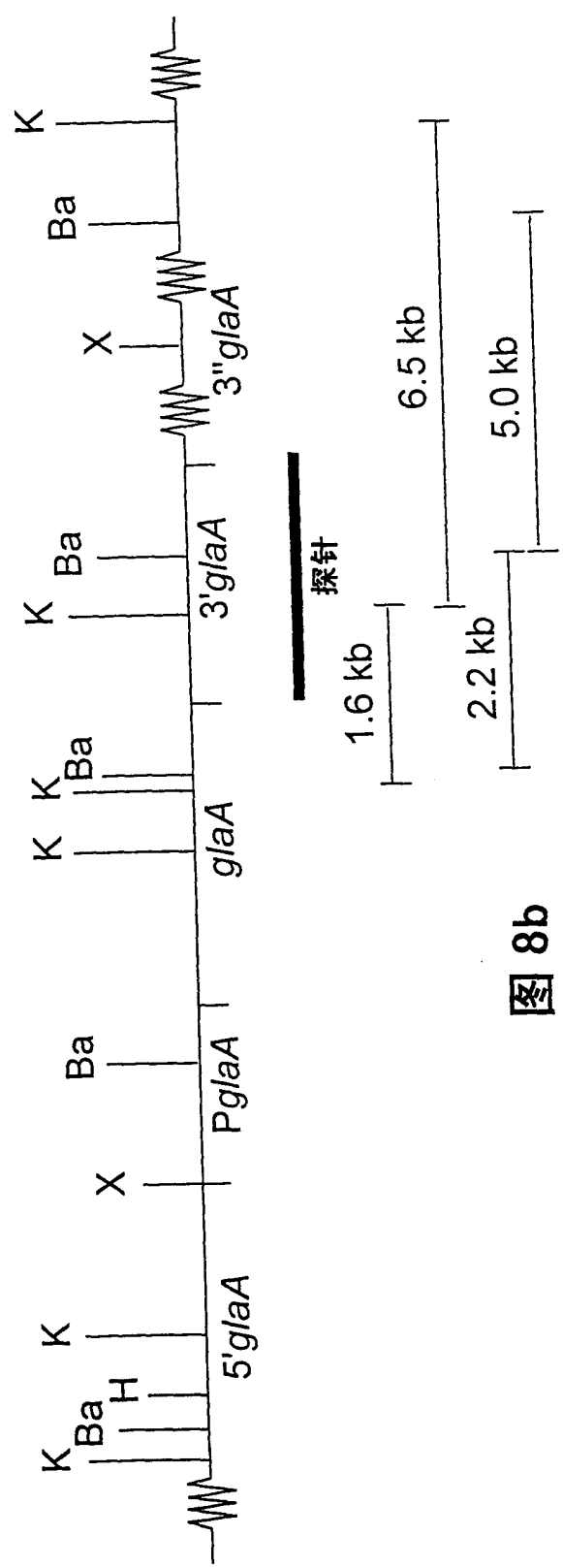


图 8b

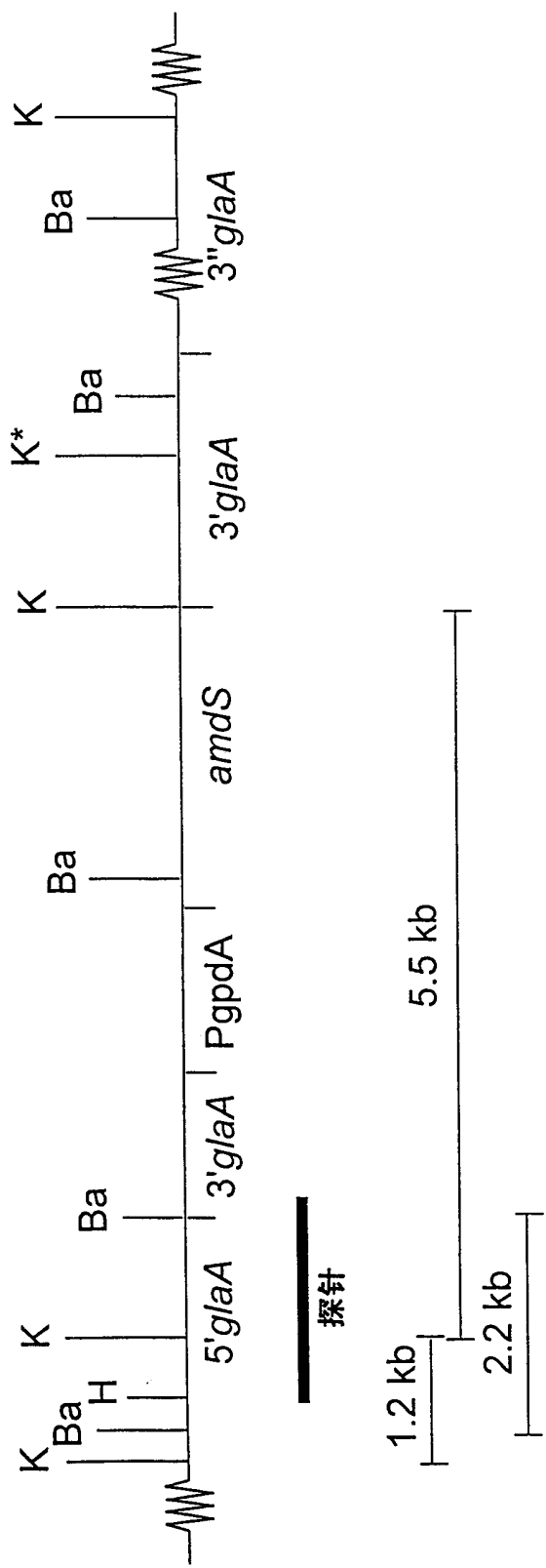


图 9a

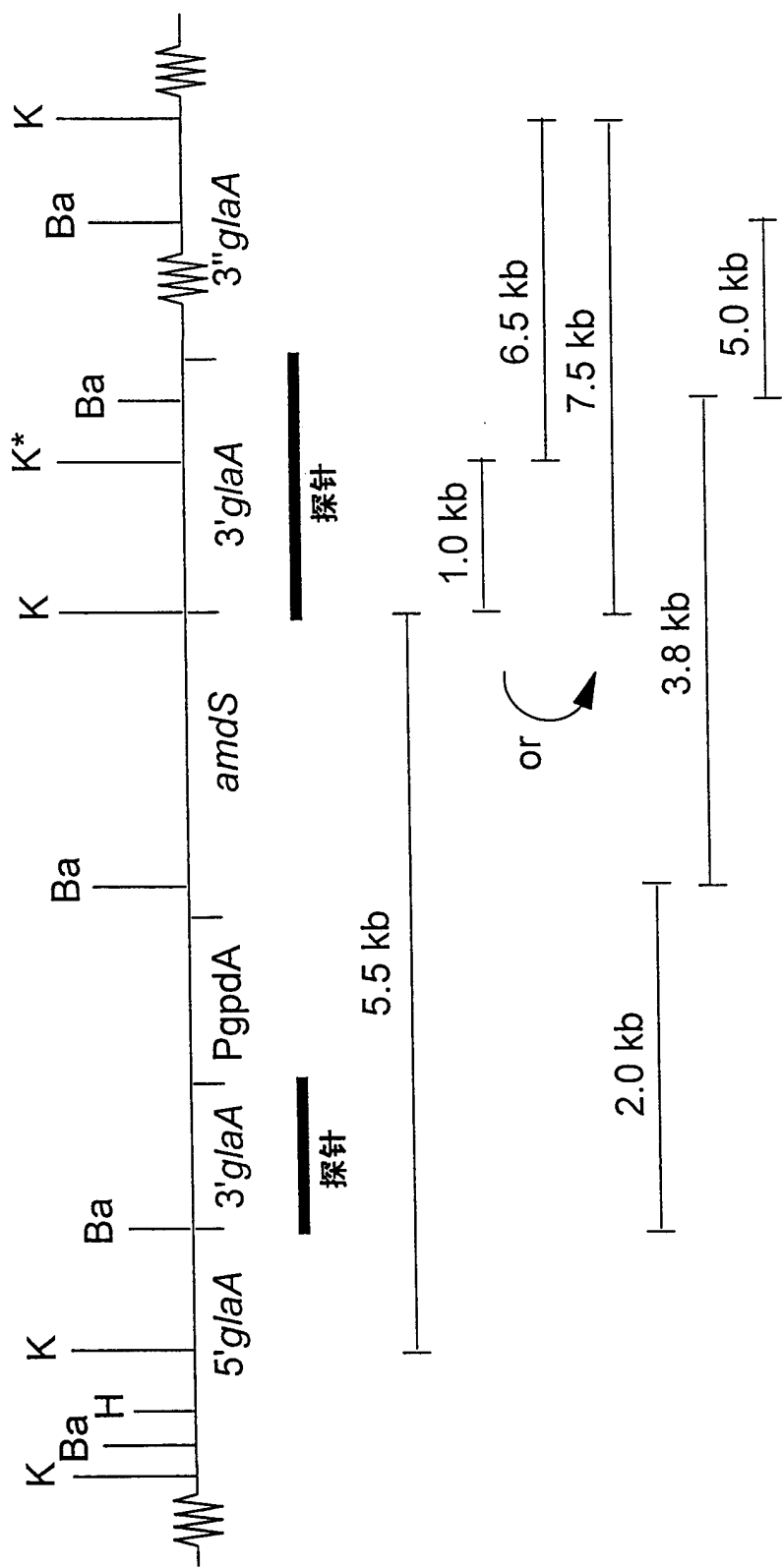


图 9b

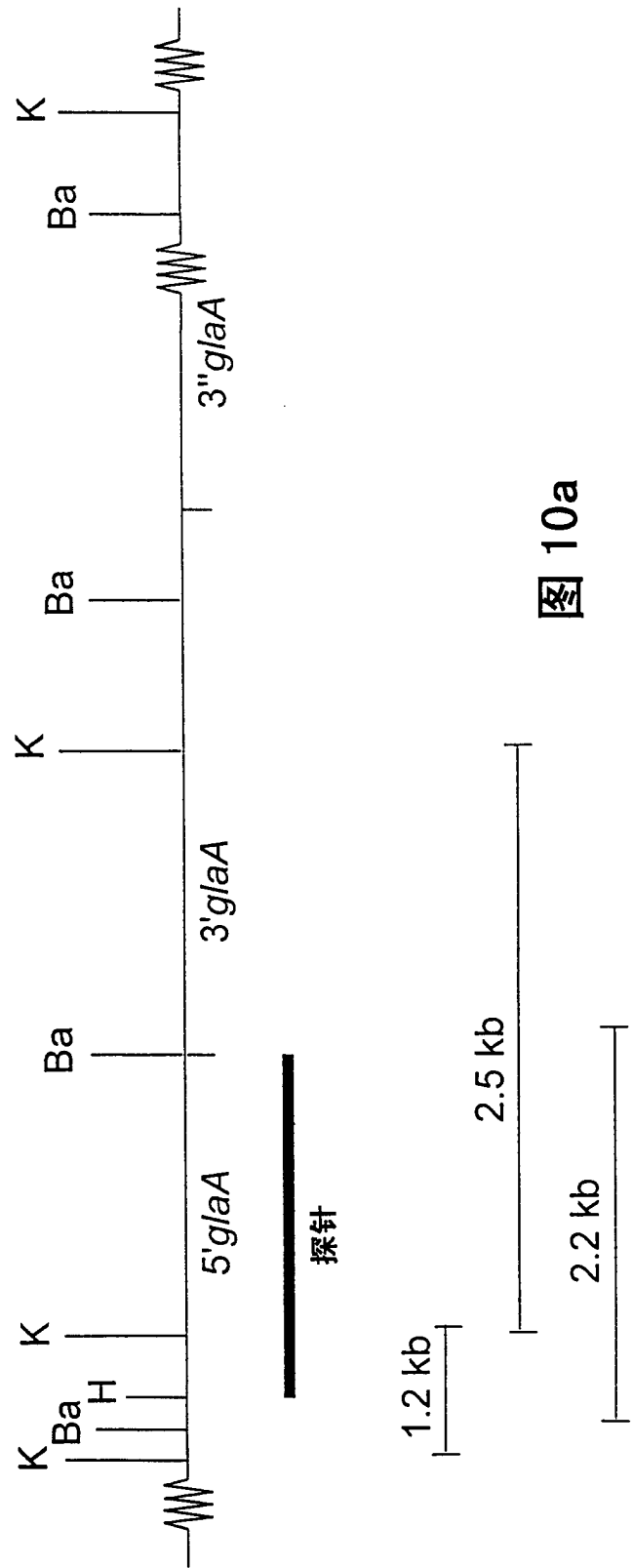


图 10a

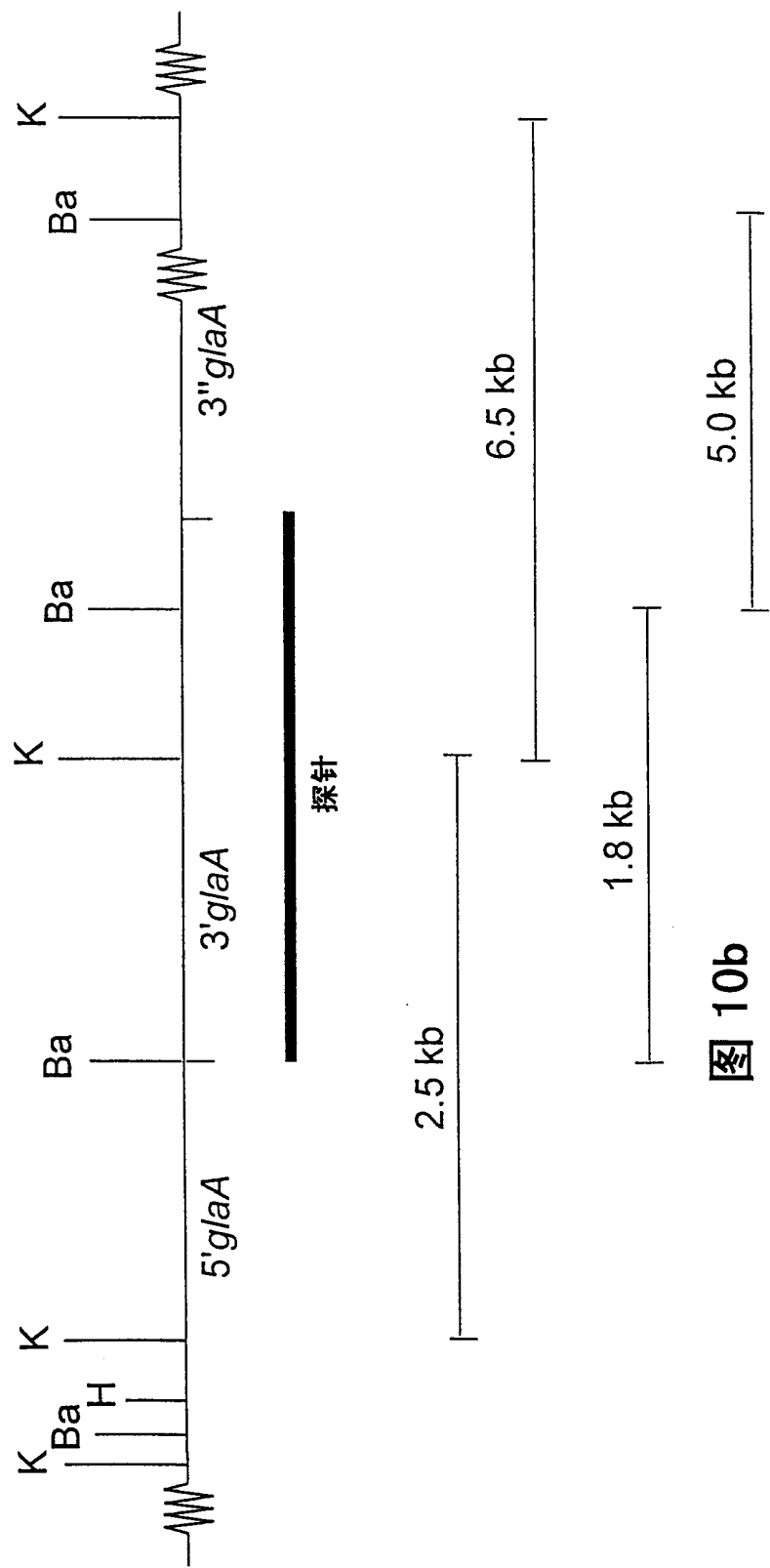


图 10b

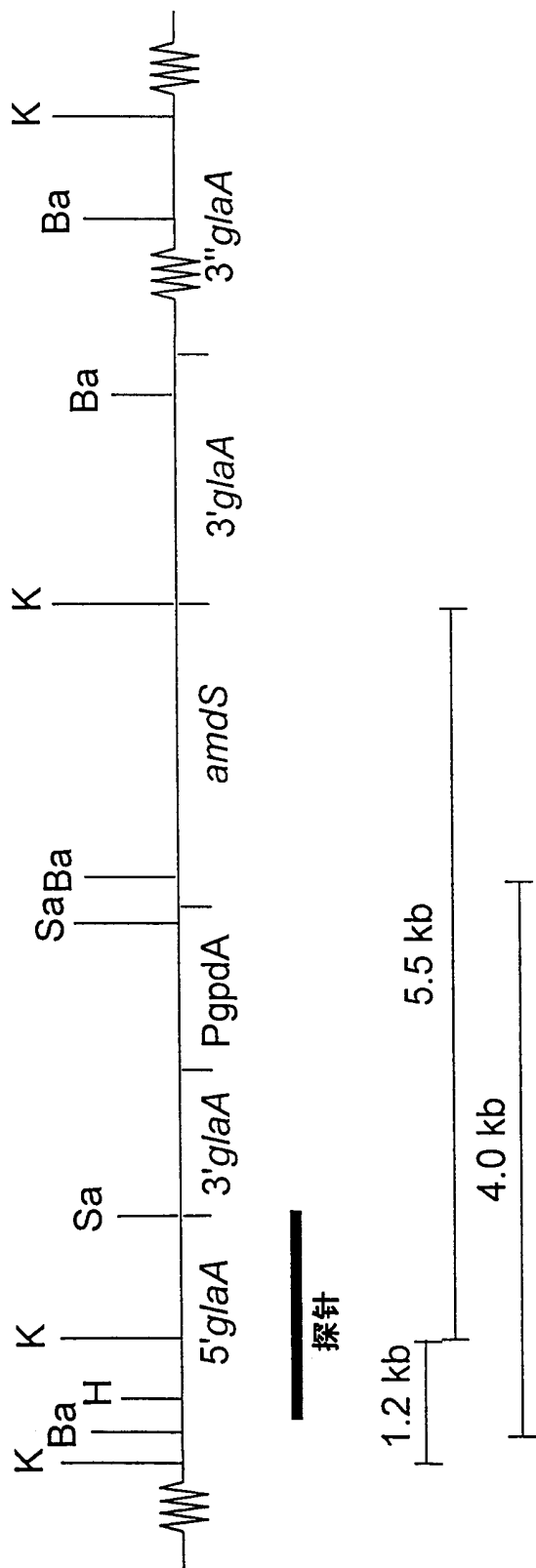


图 11a

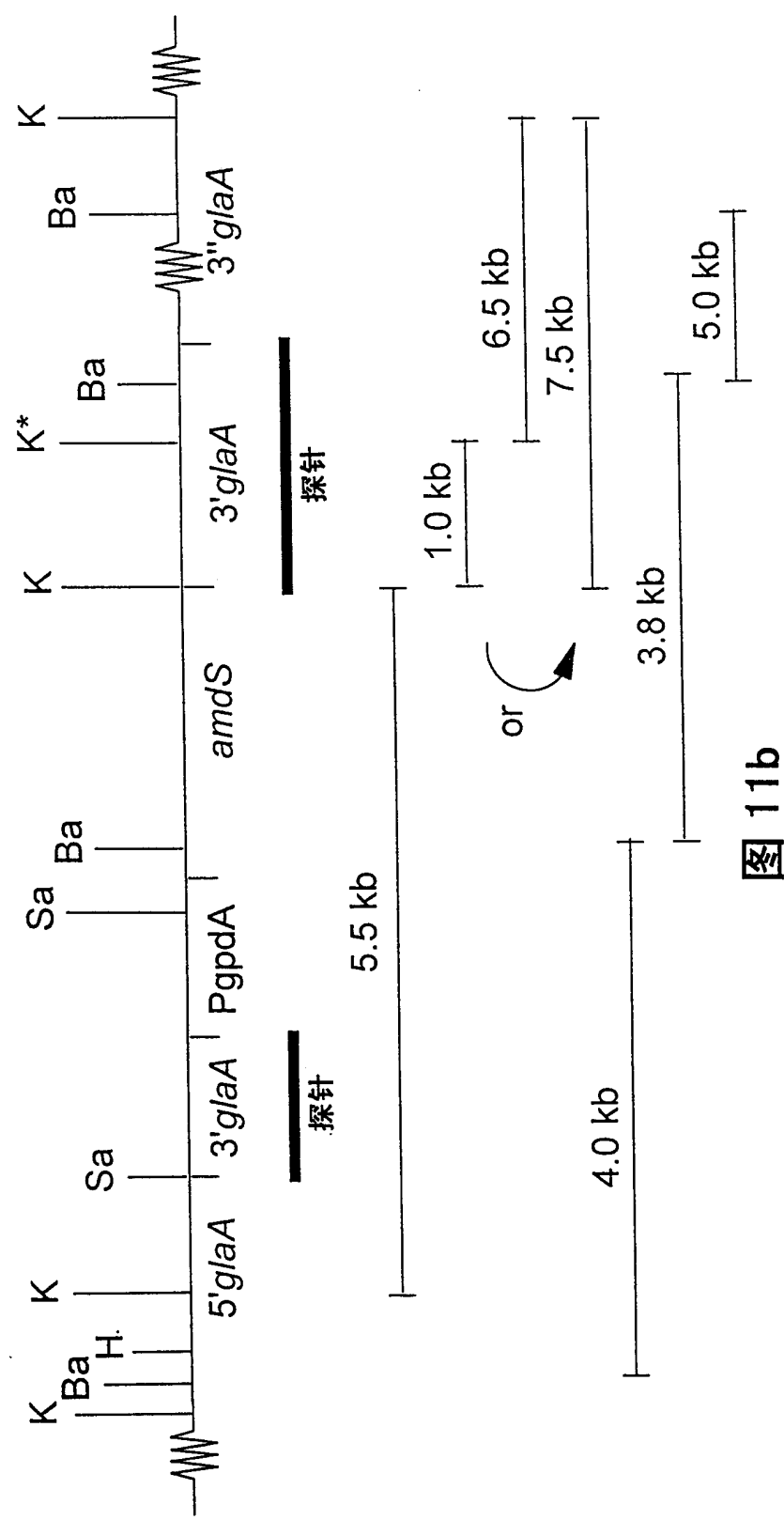
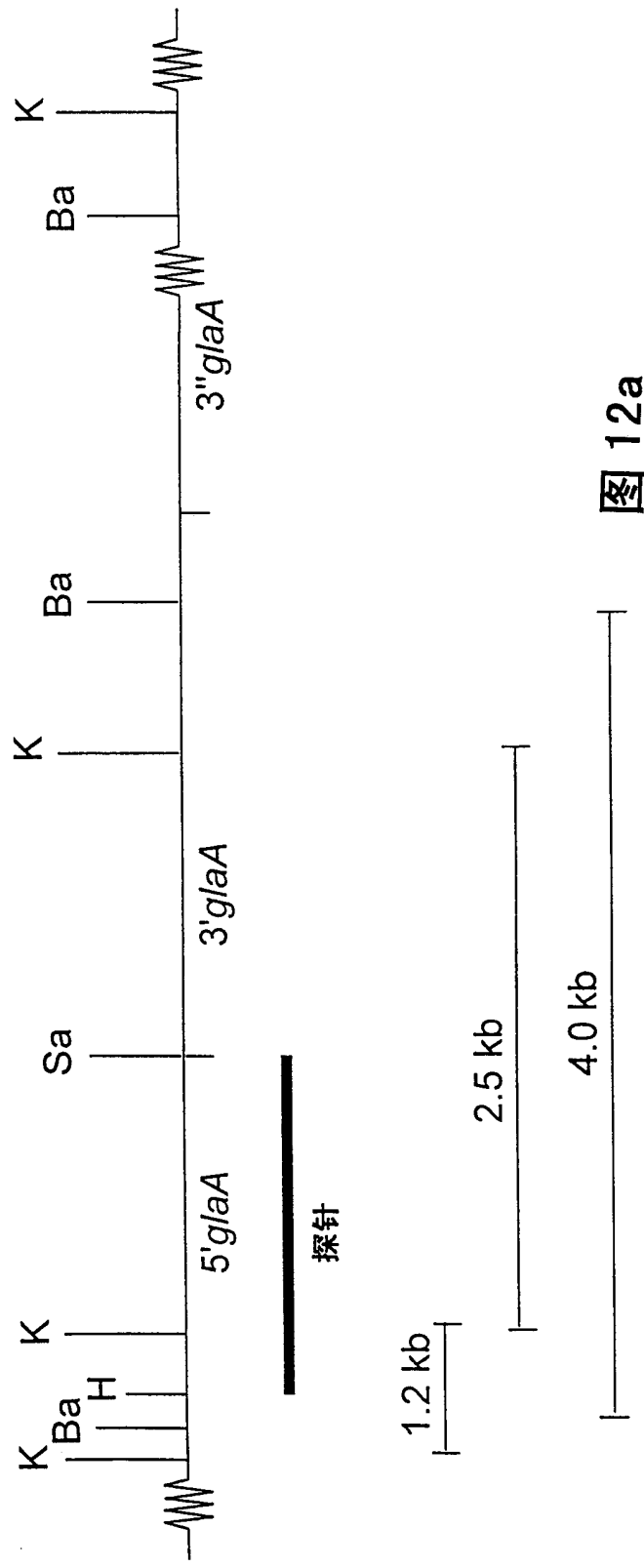


图 11b



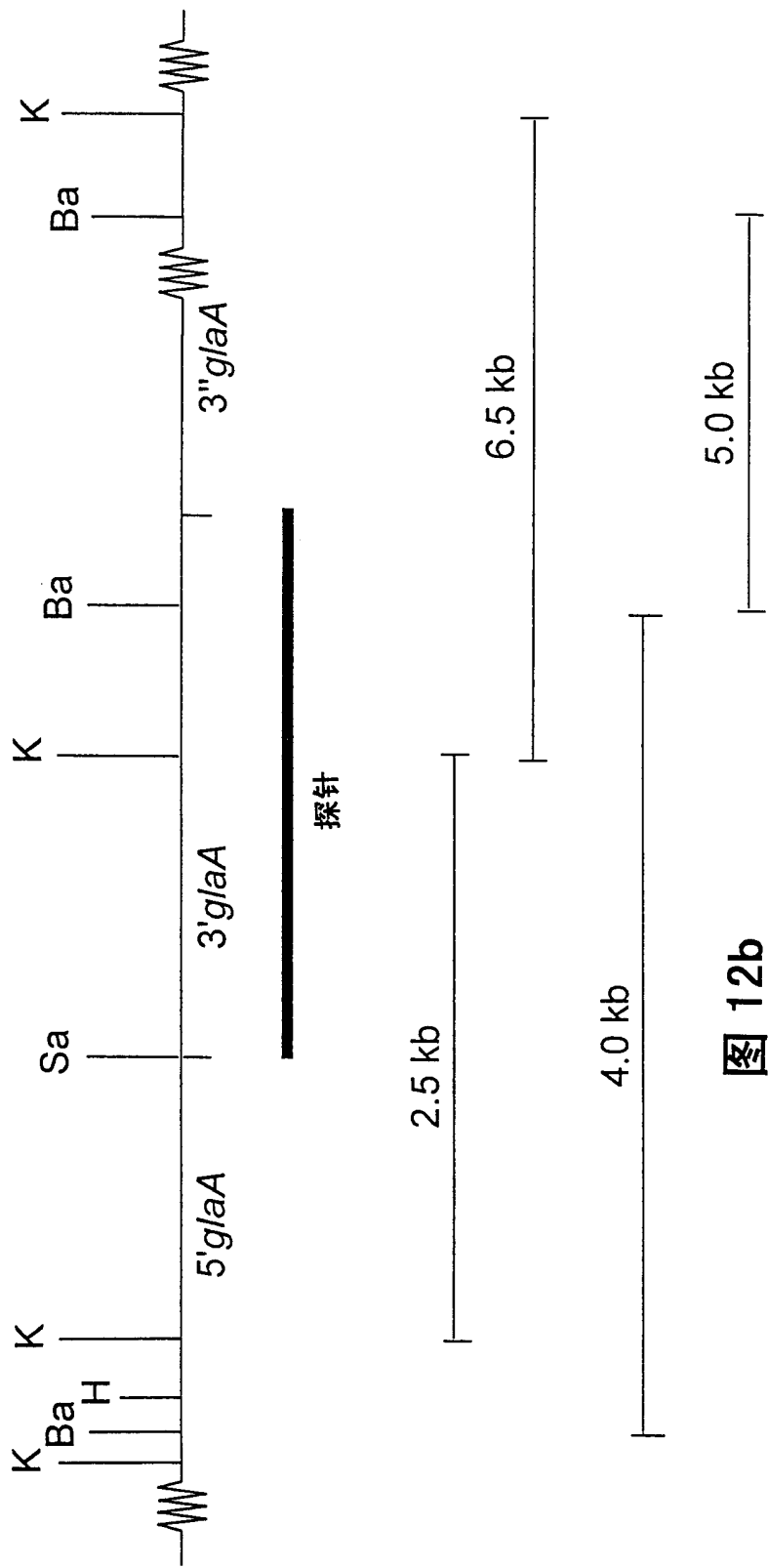
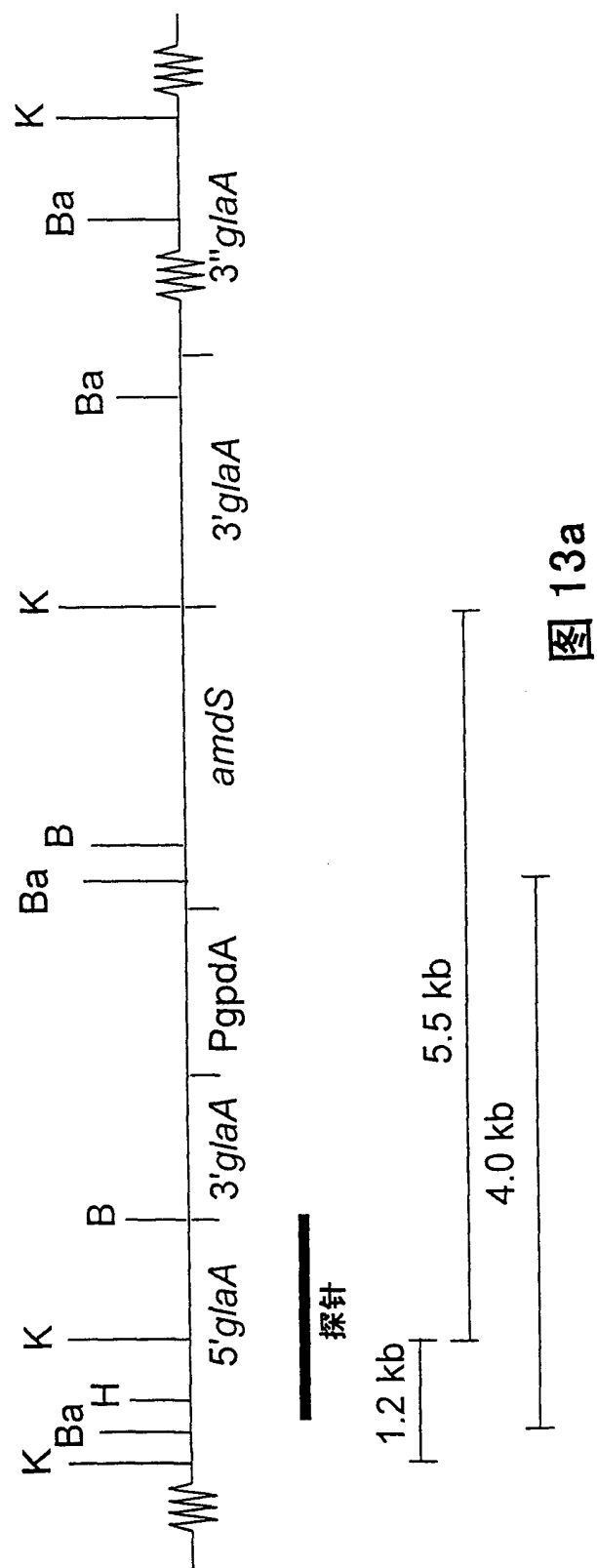


图 12b



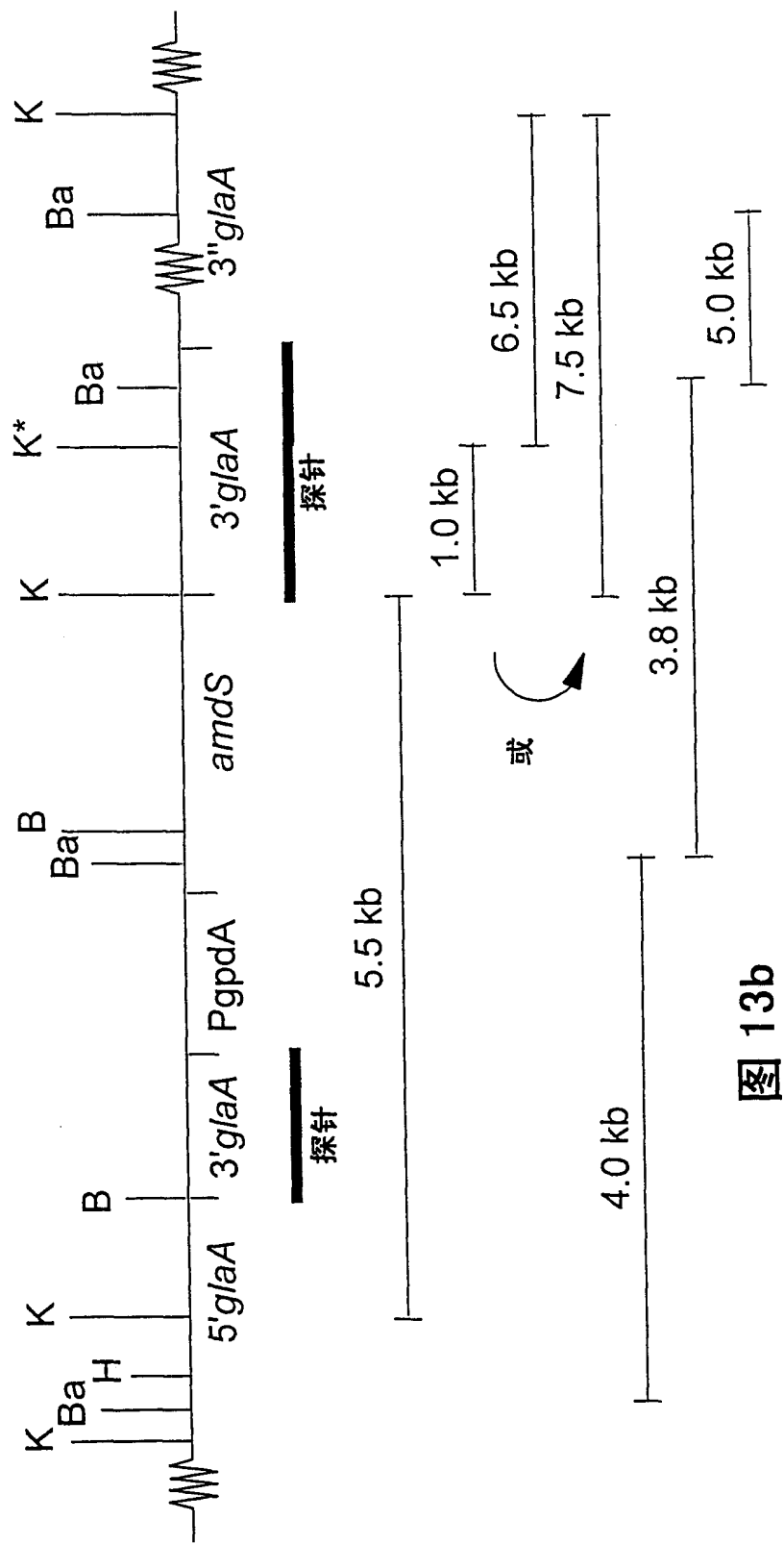
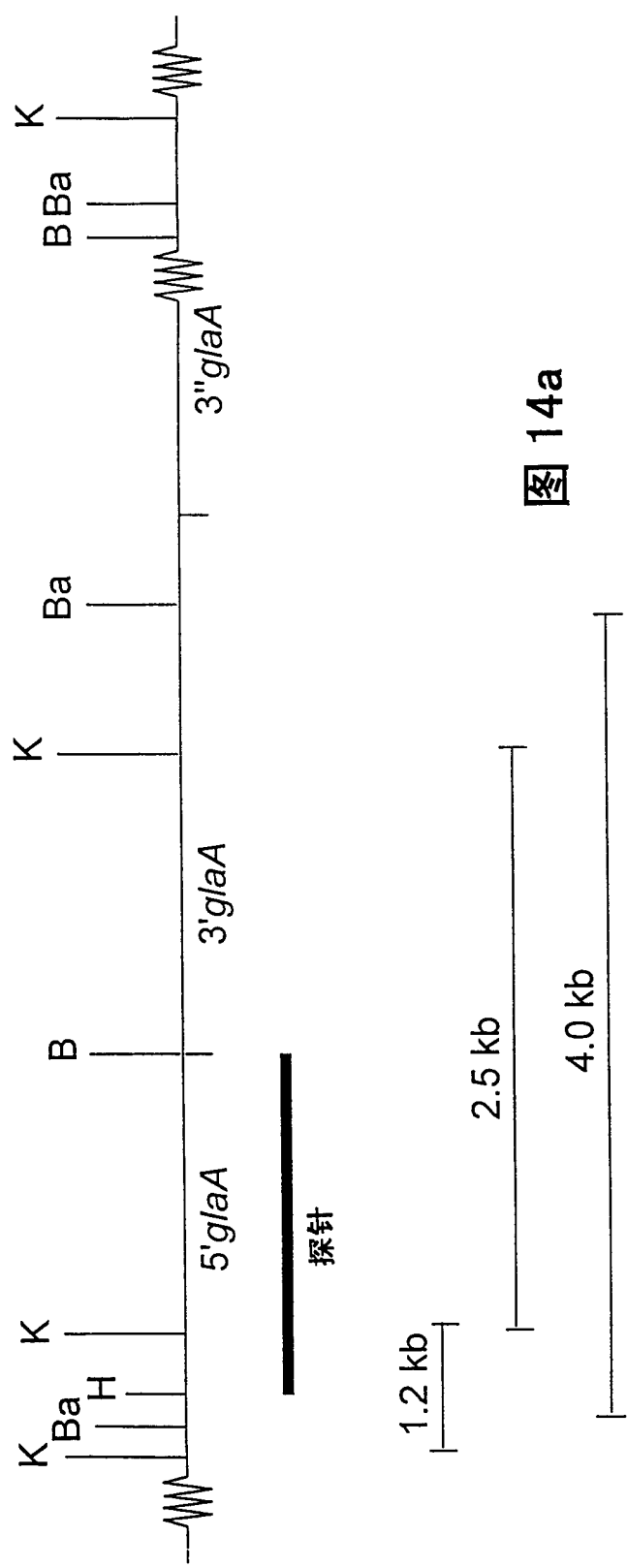


图 13b



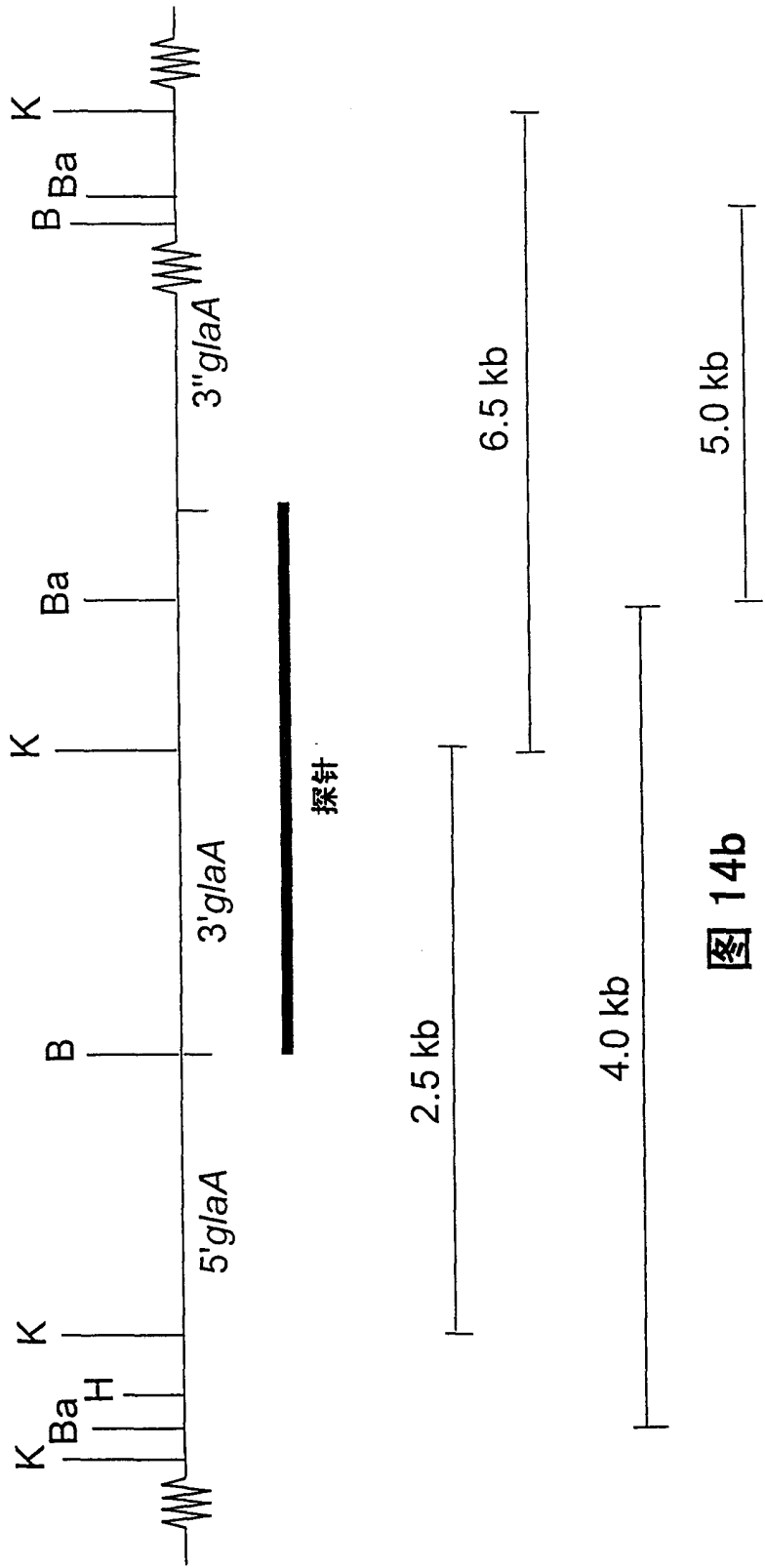


图 14b

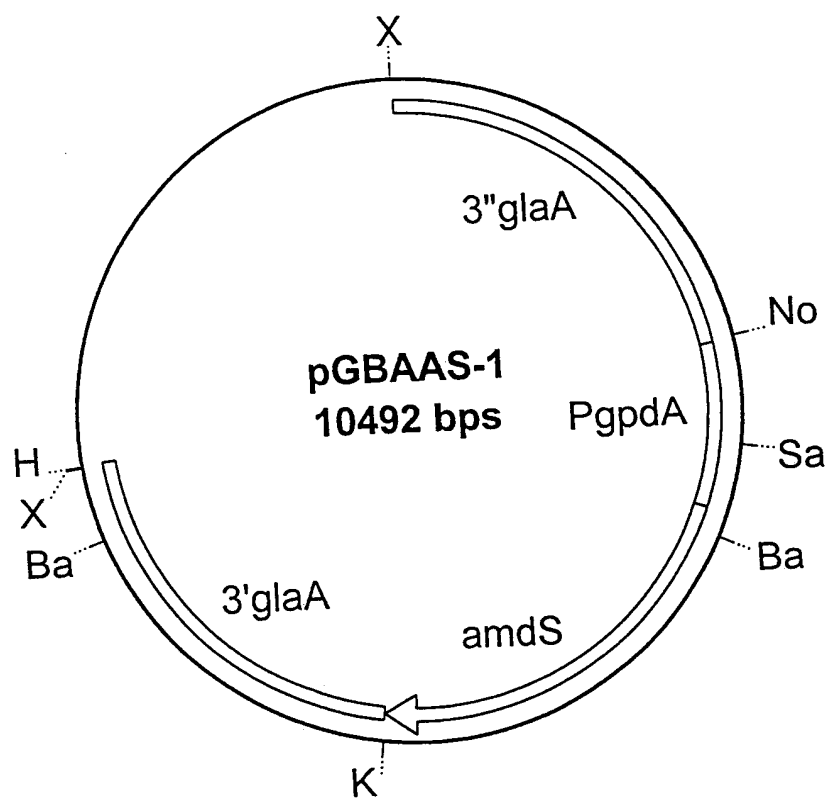


图 15

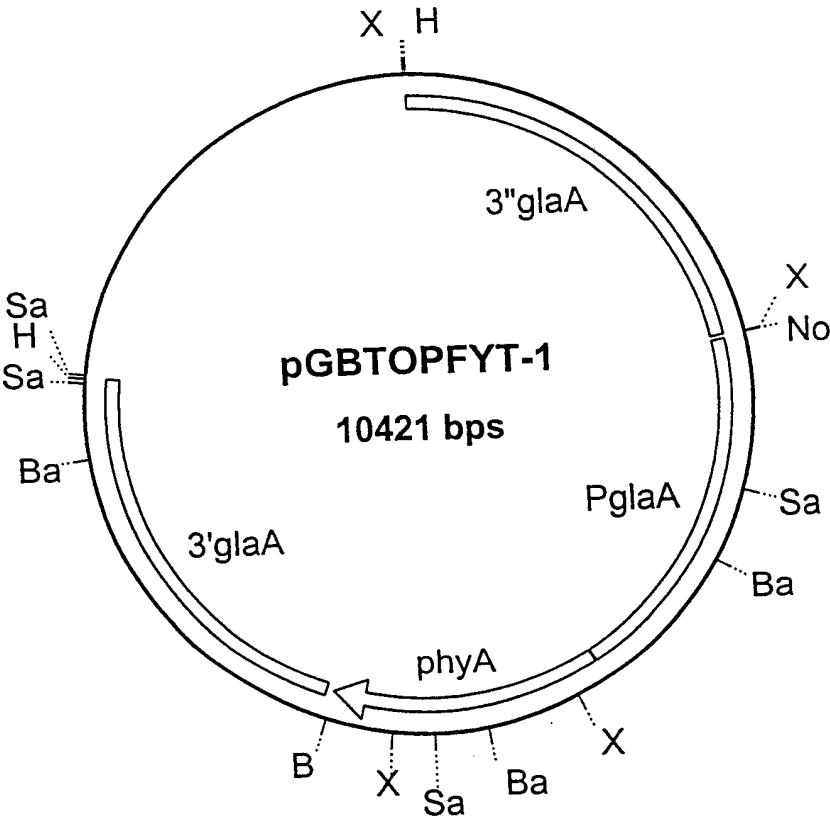


图 16

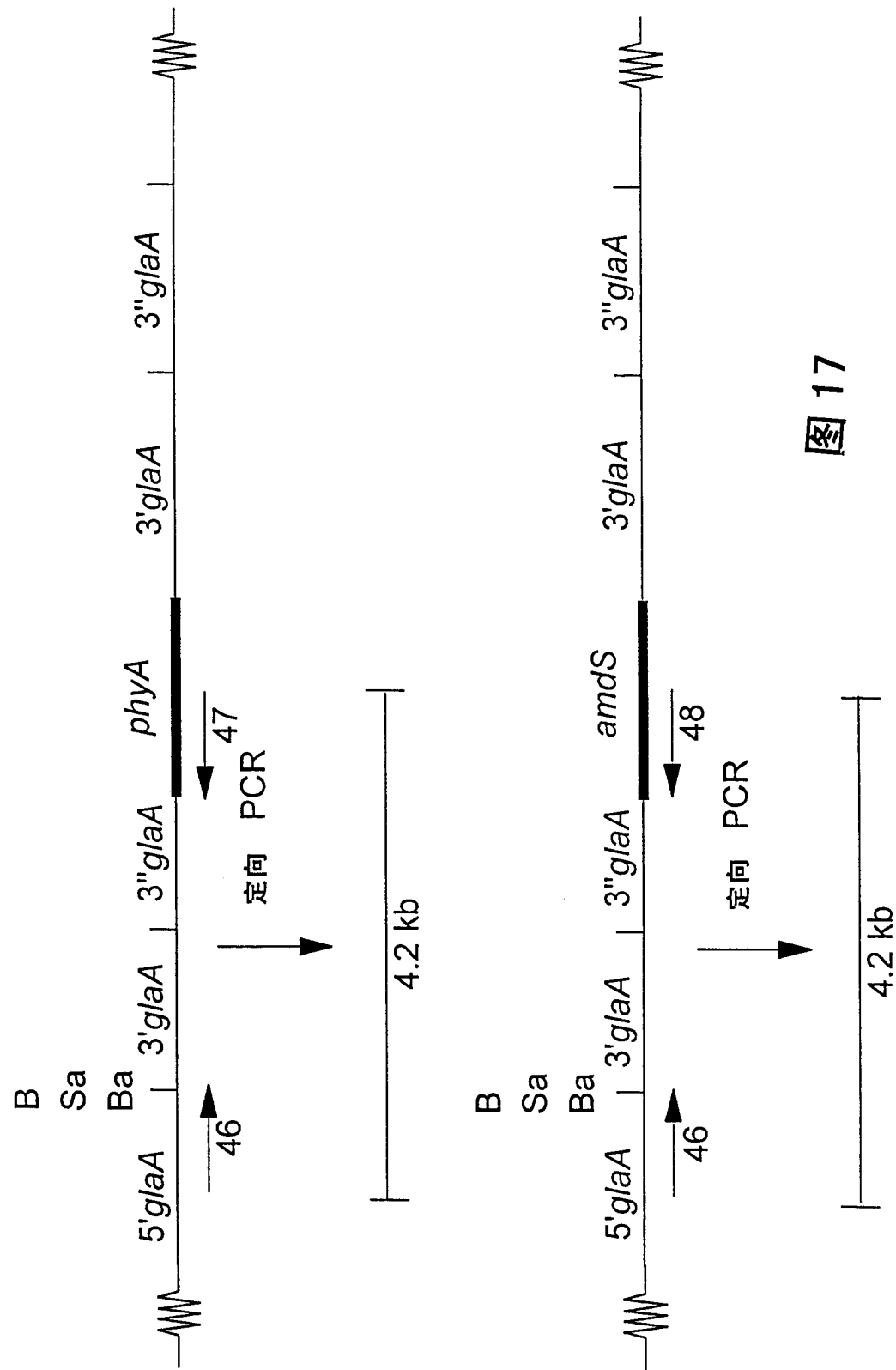


图 17

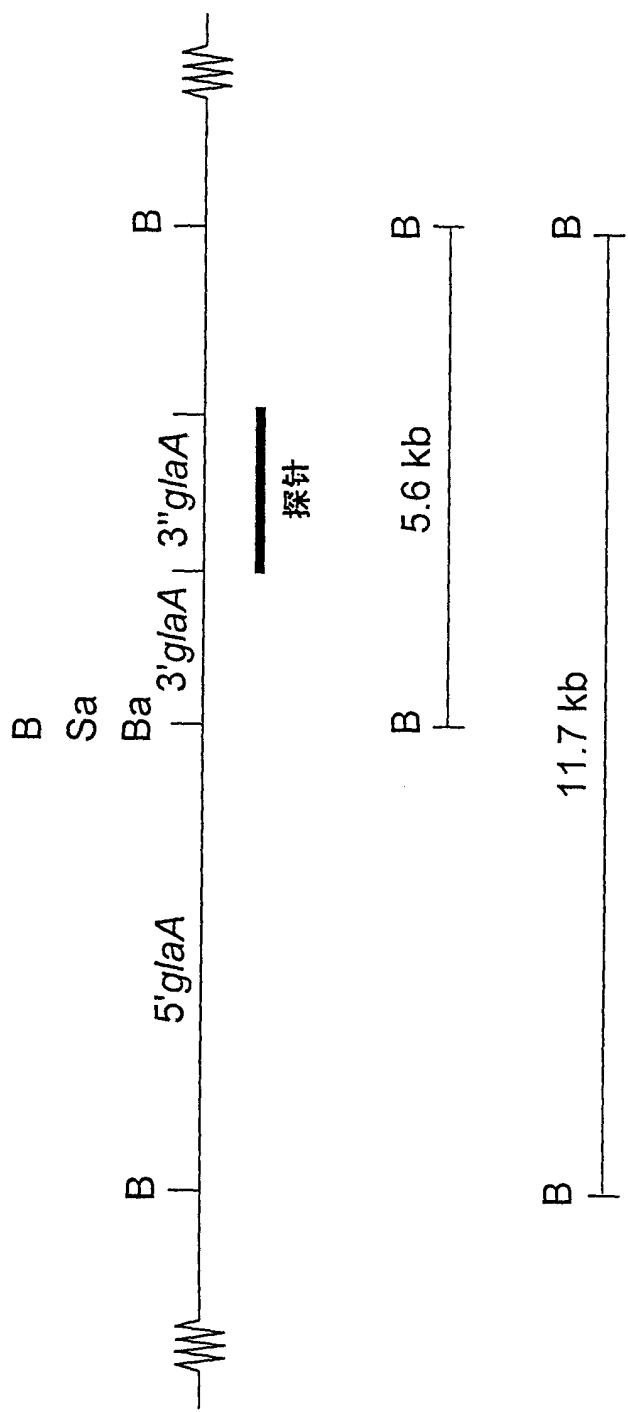
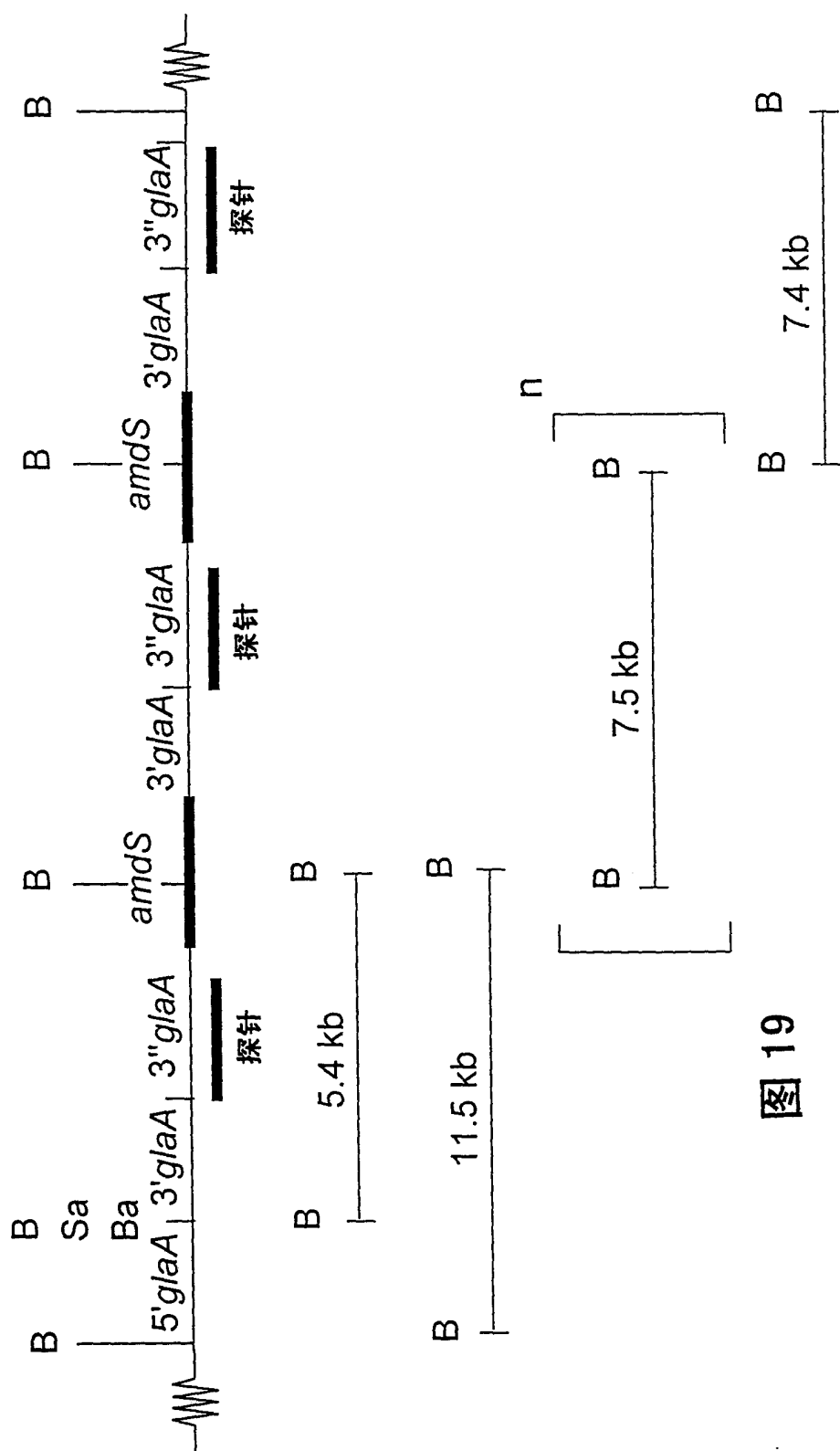
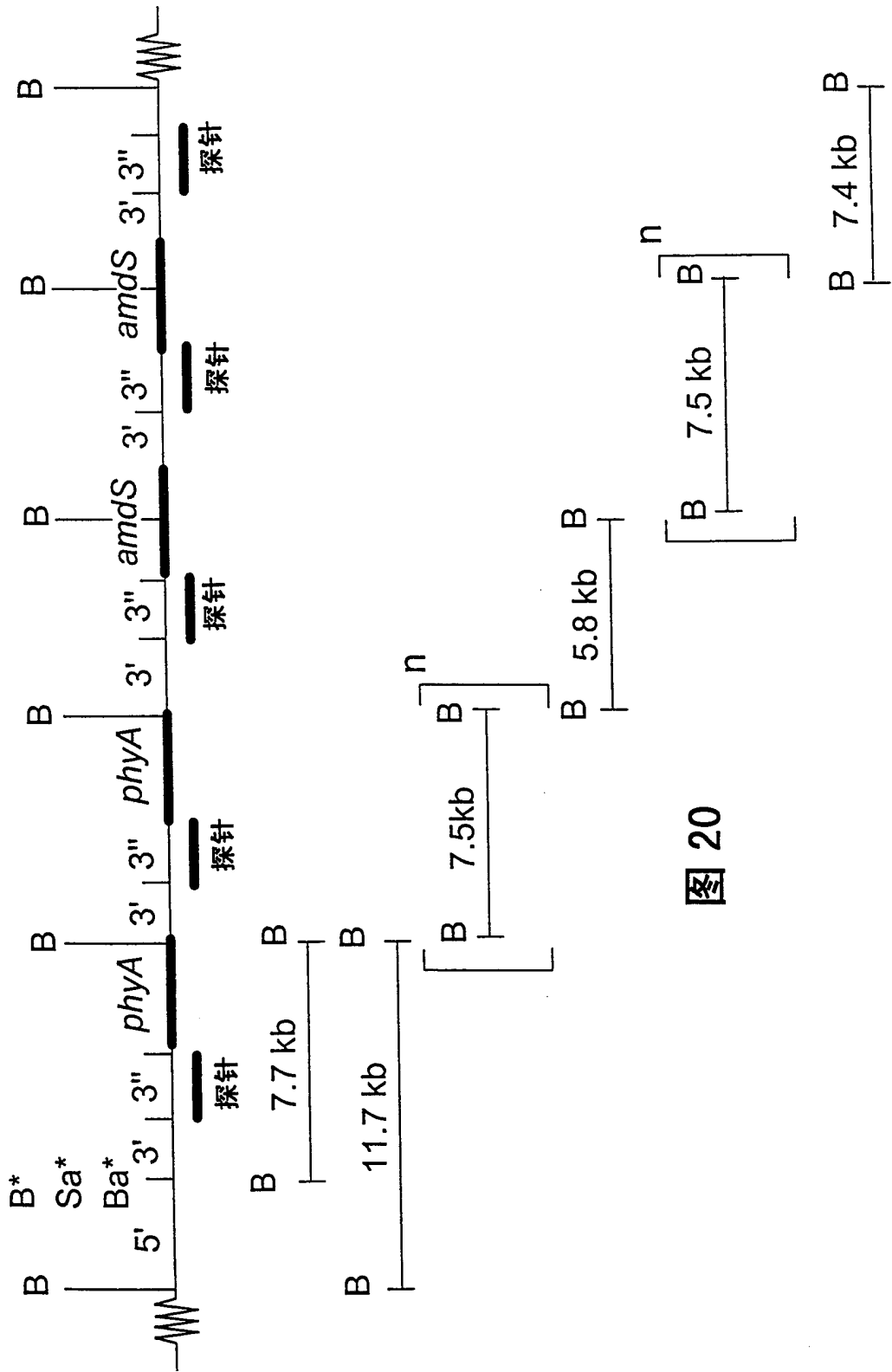
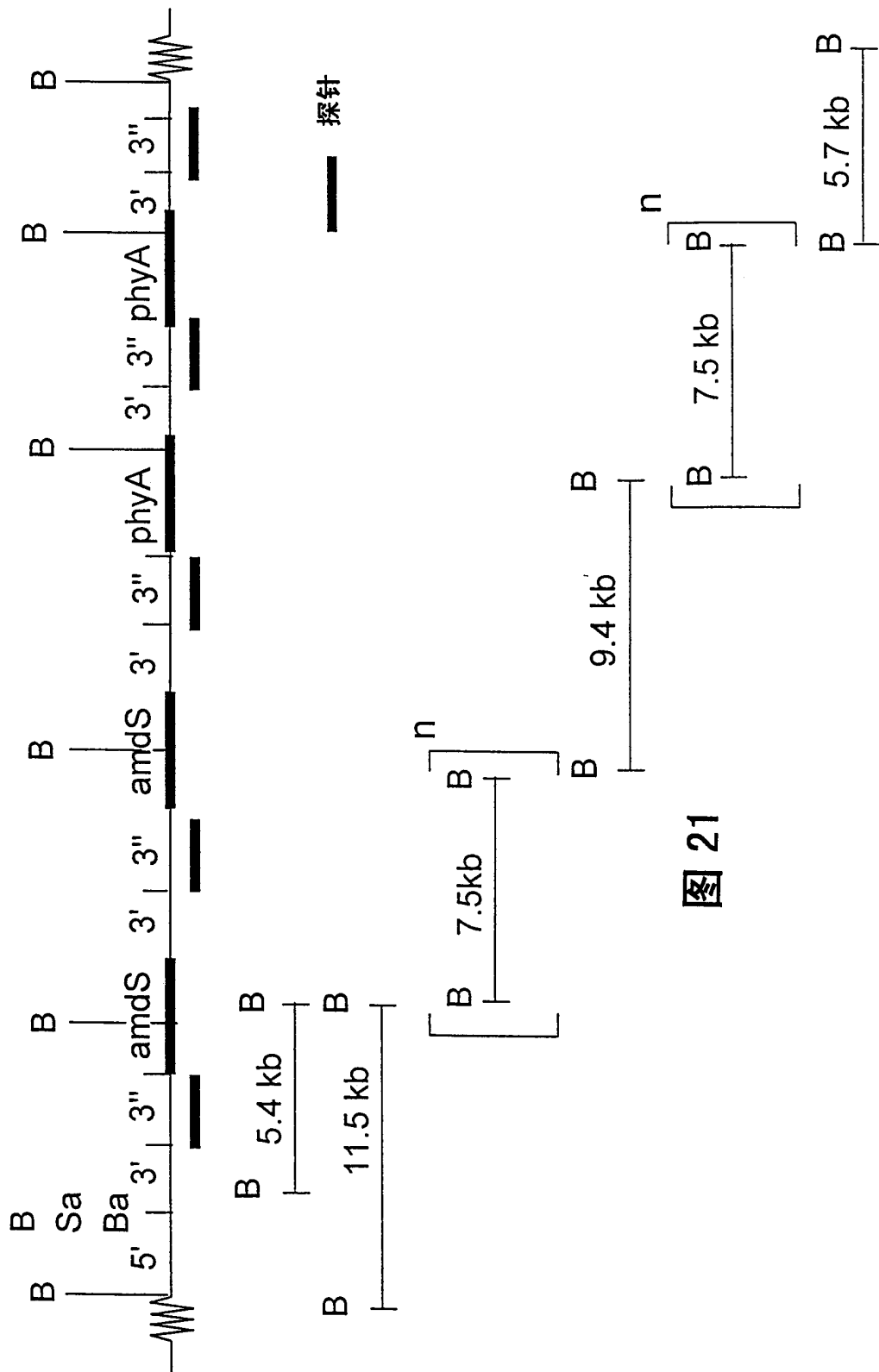
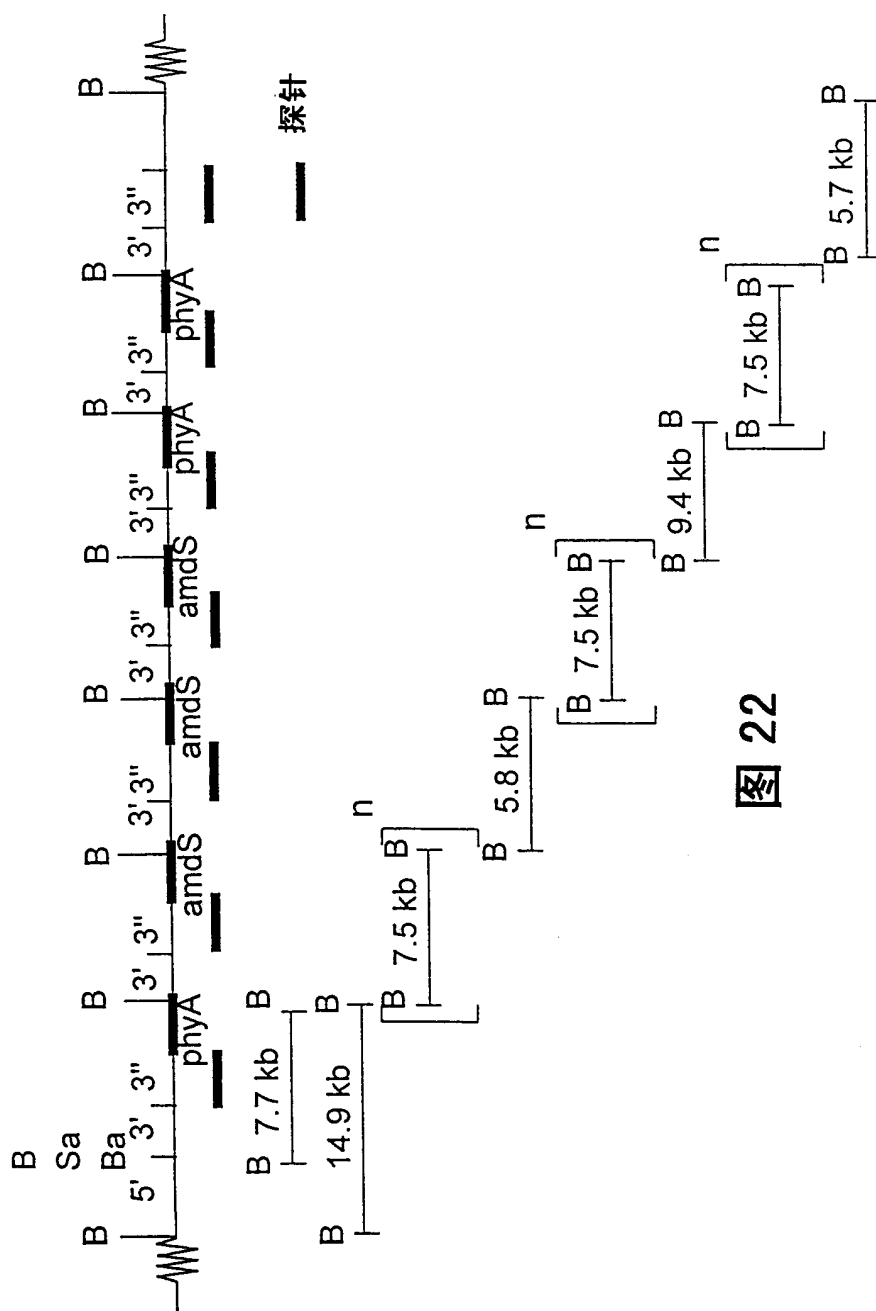


图 18









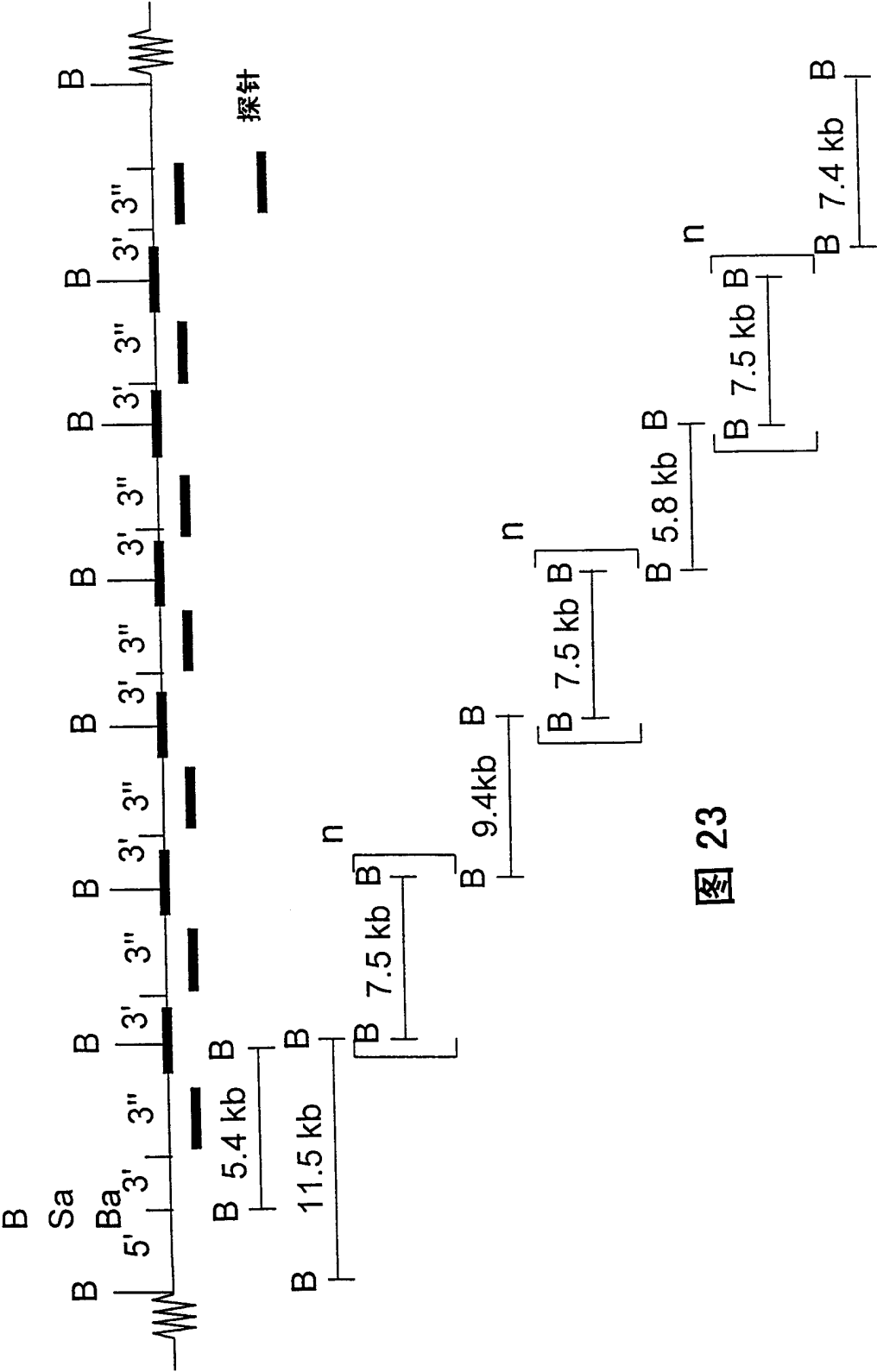


图 23

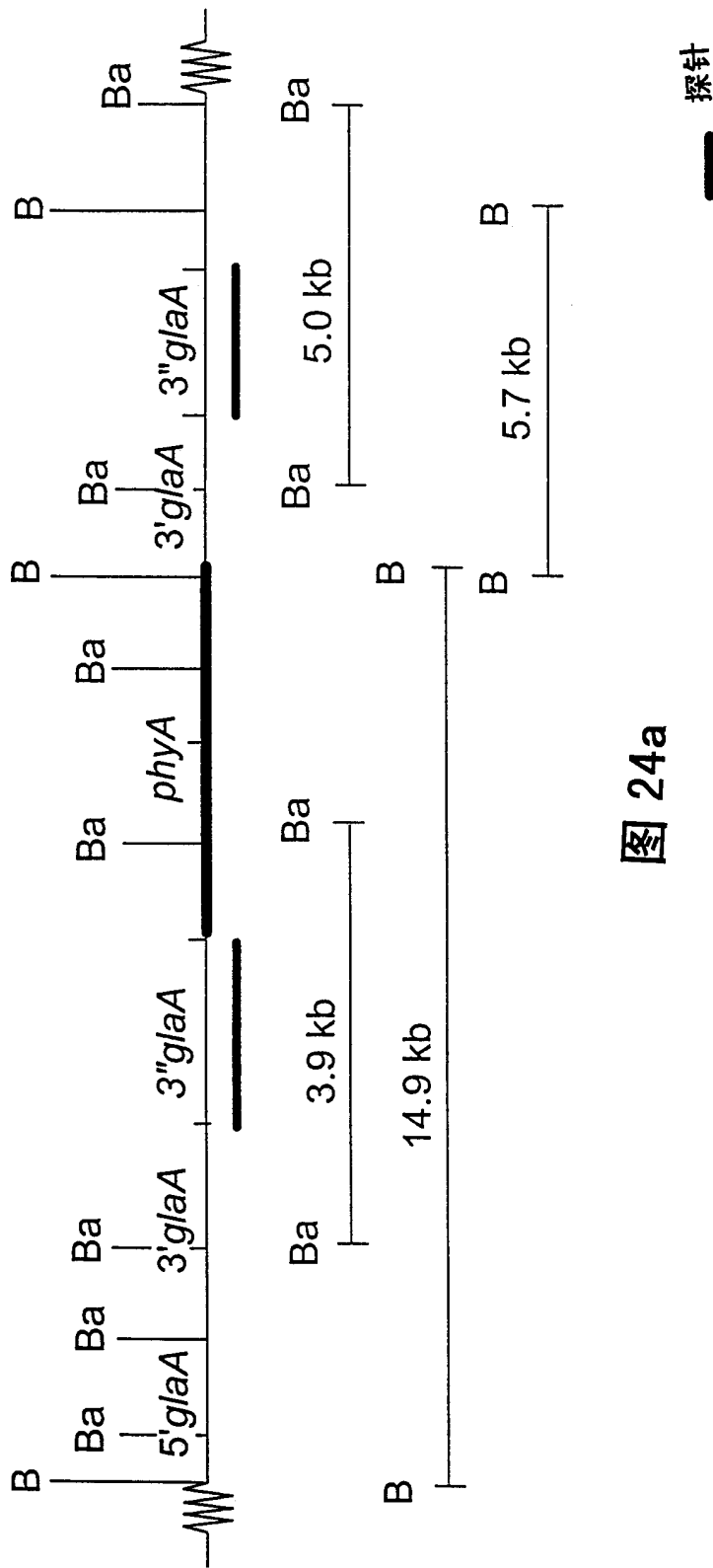


图 24a

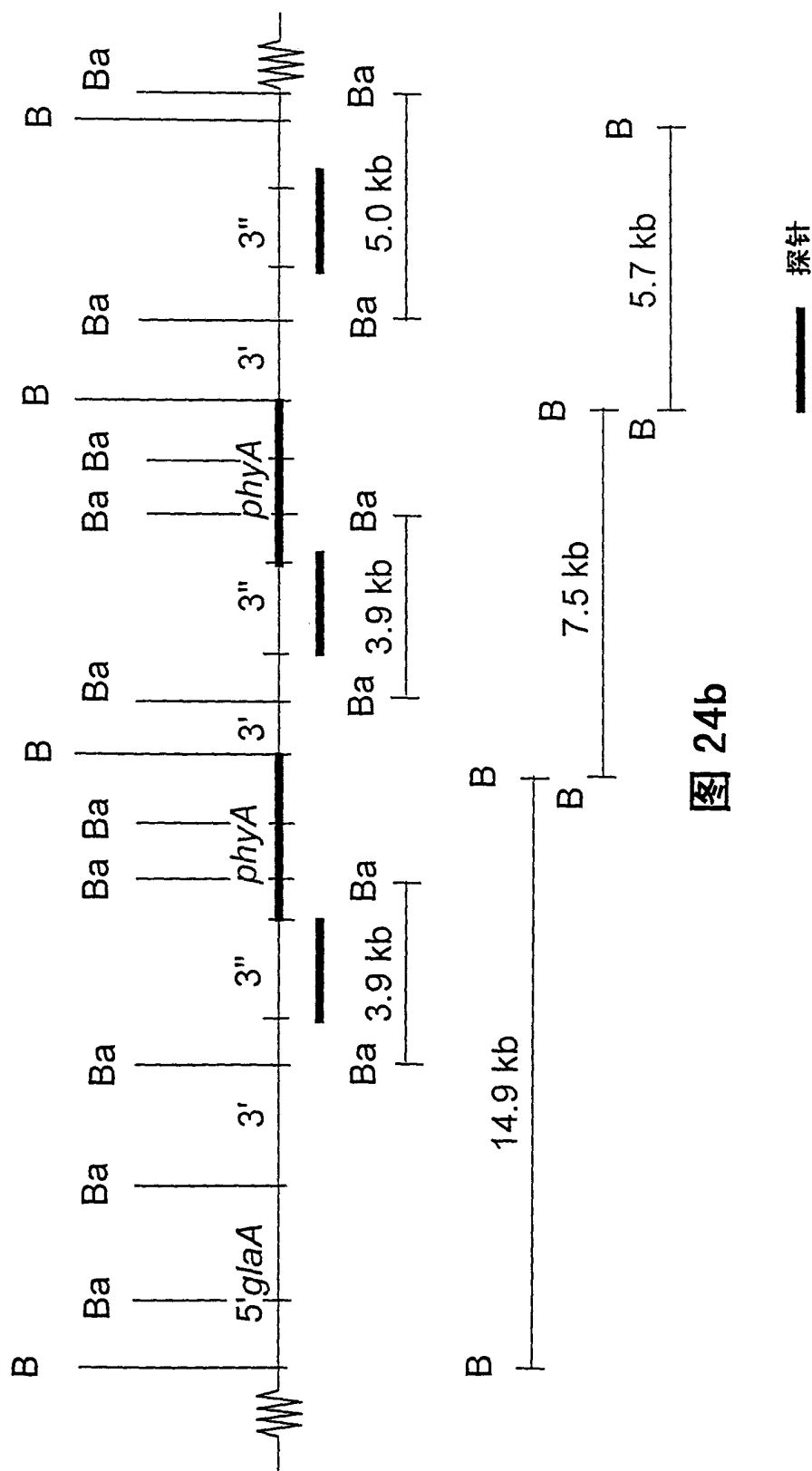


图 24b

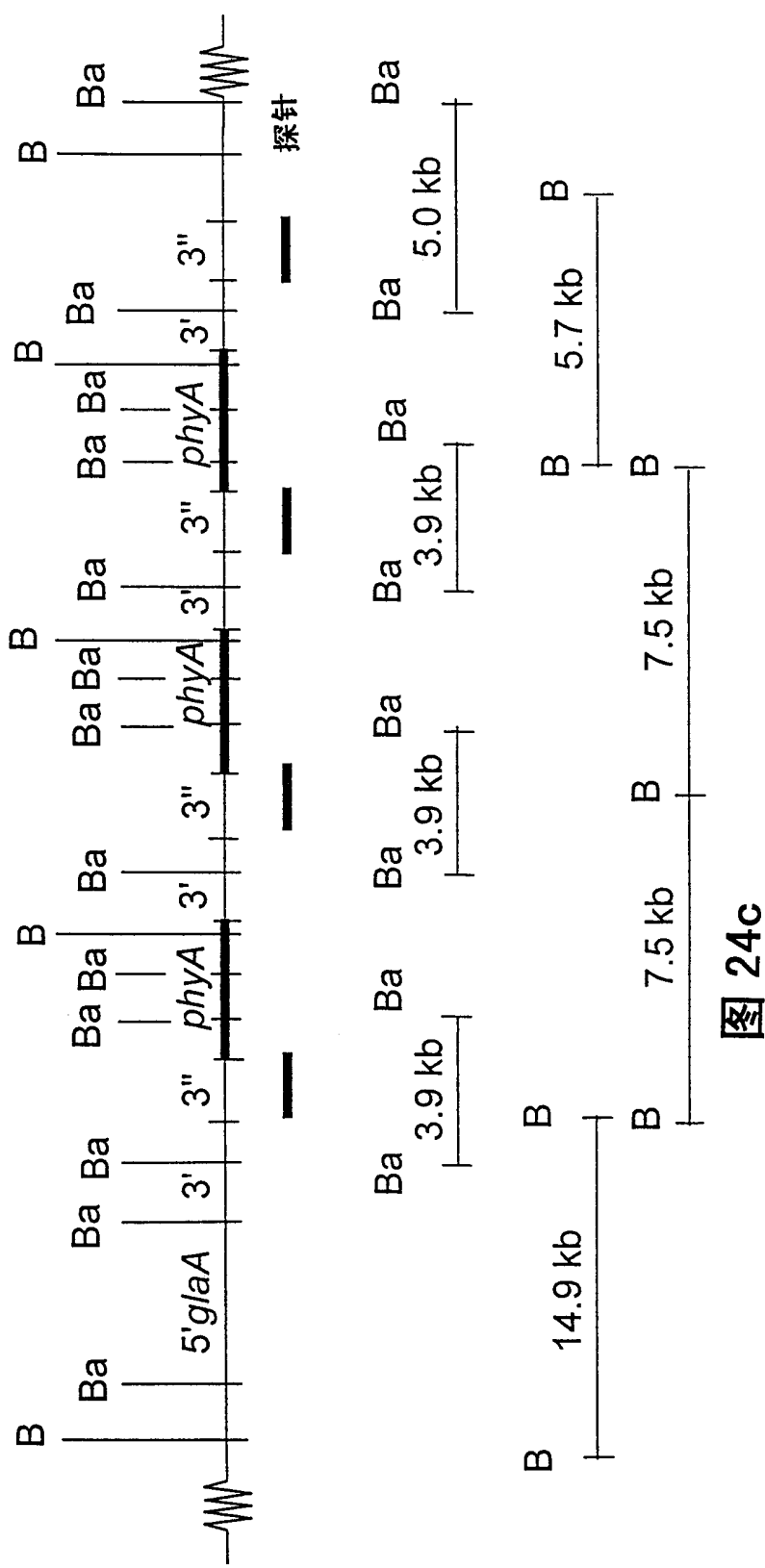


图 24c

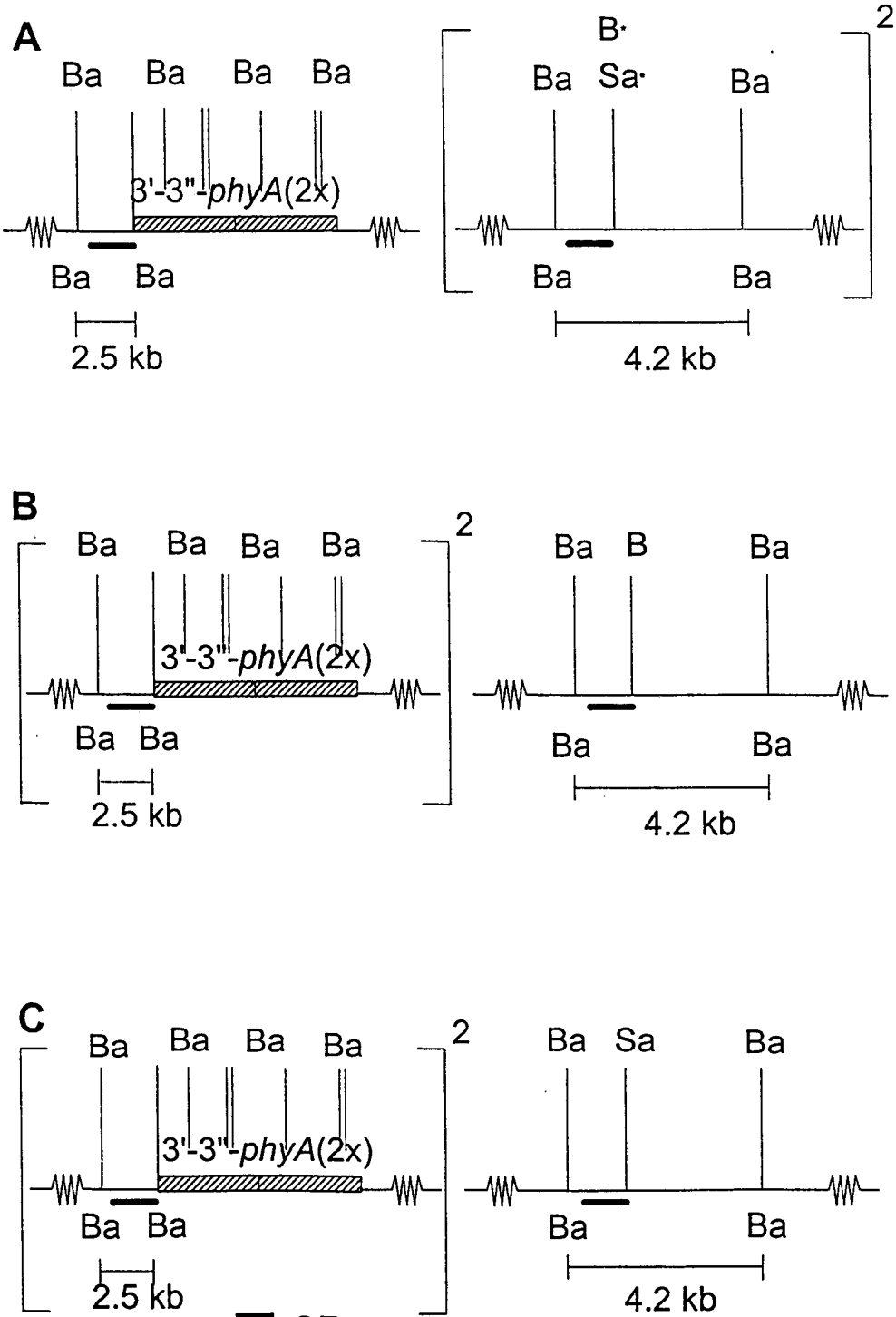


图 25

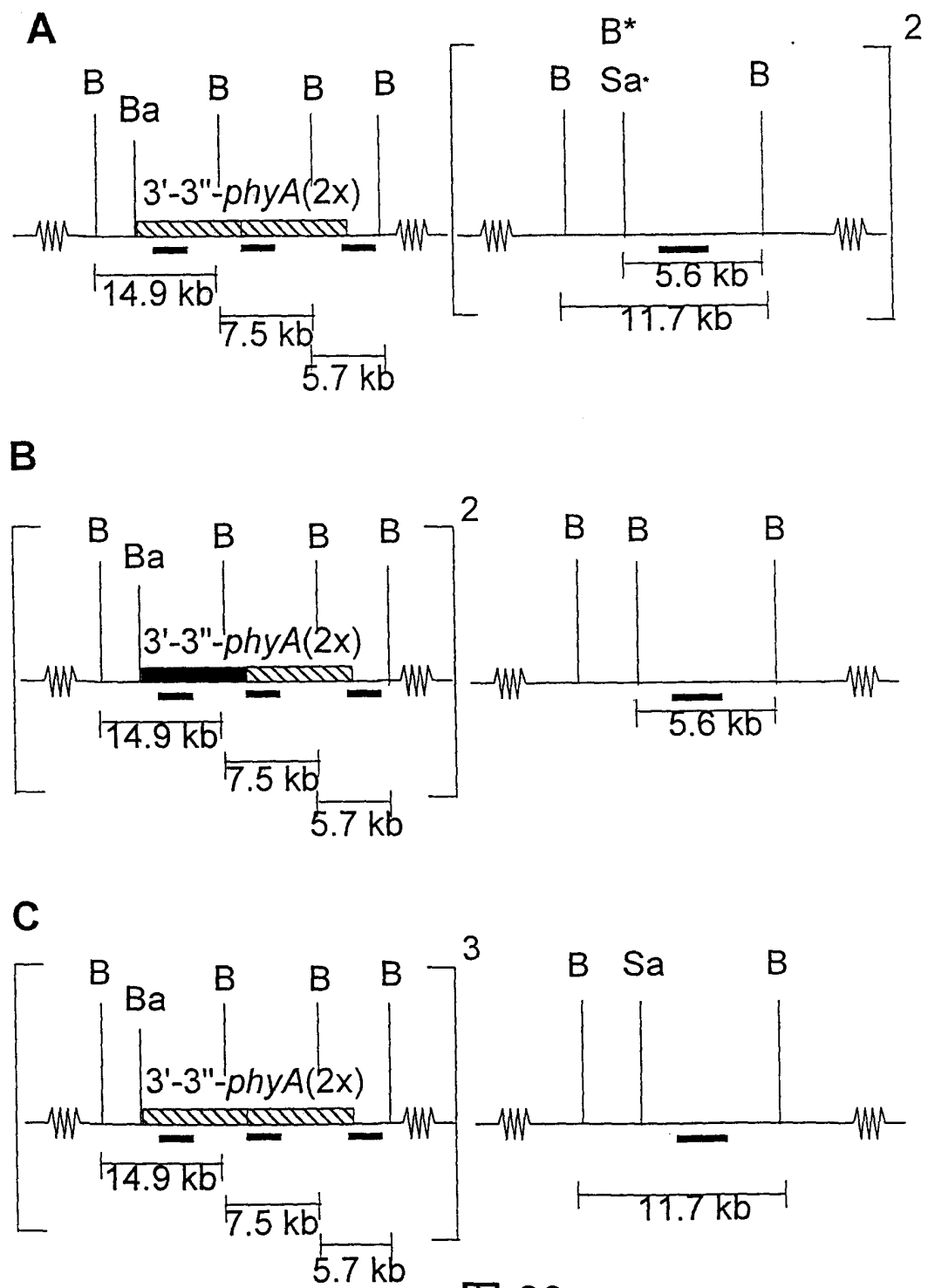


图 26

— 探针

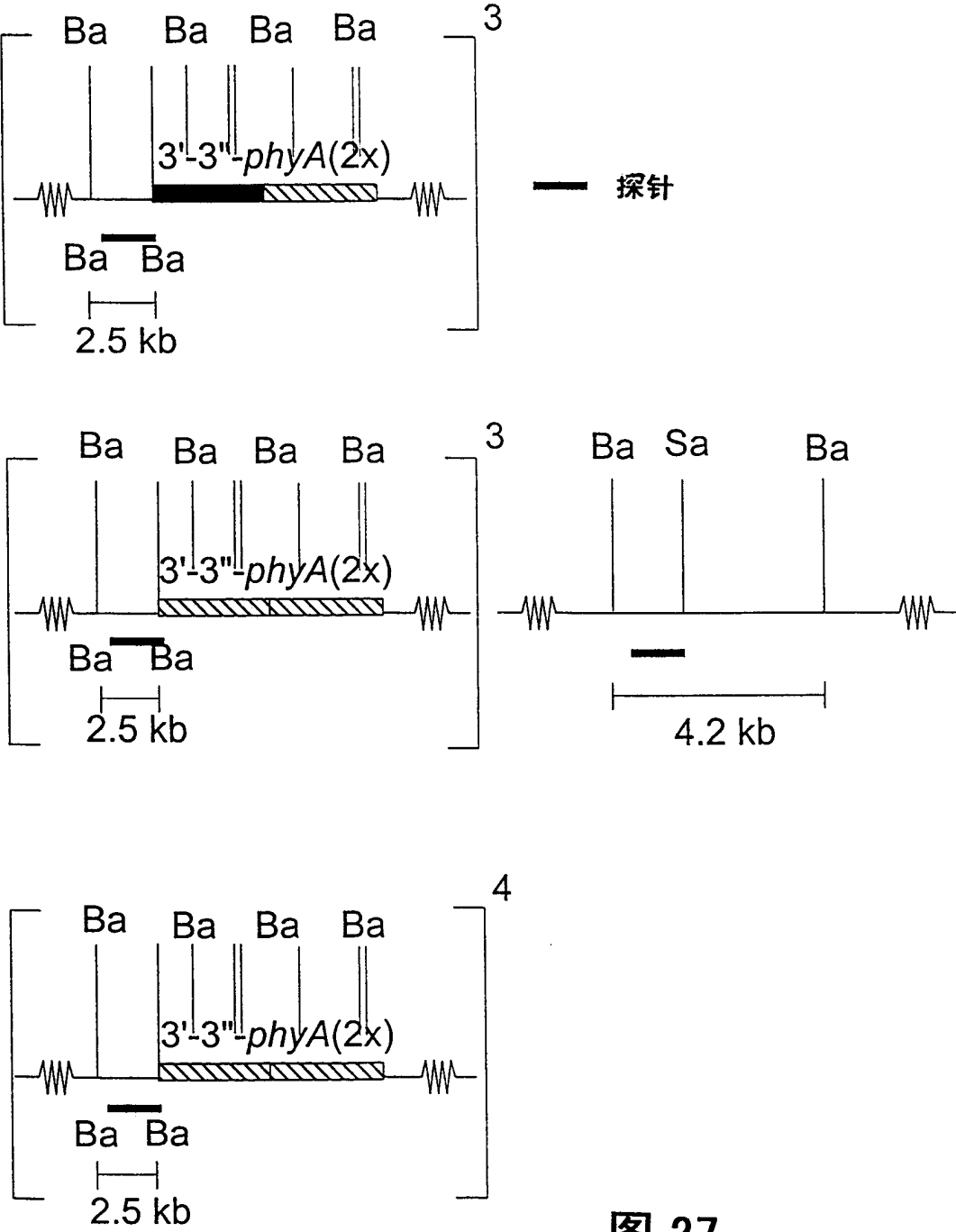


图 27

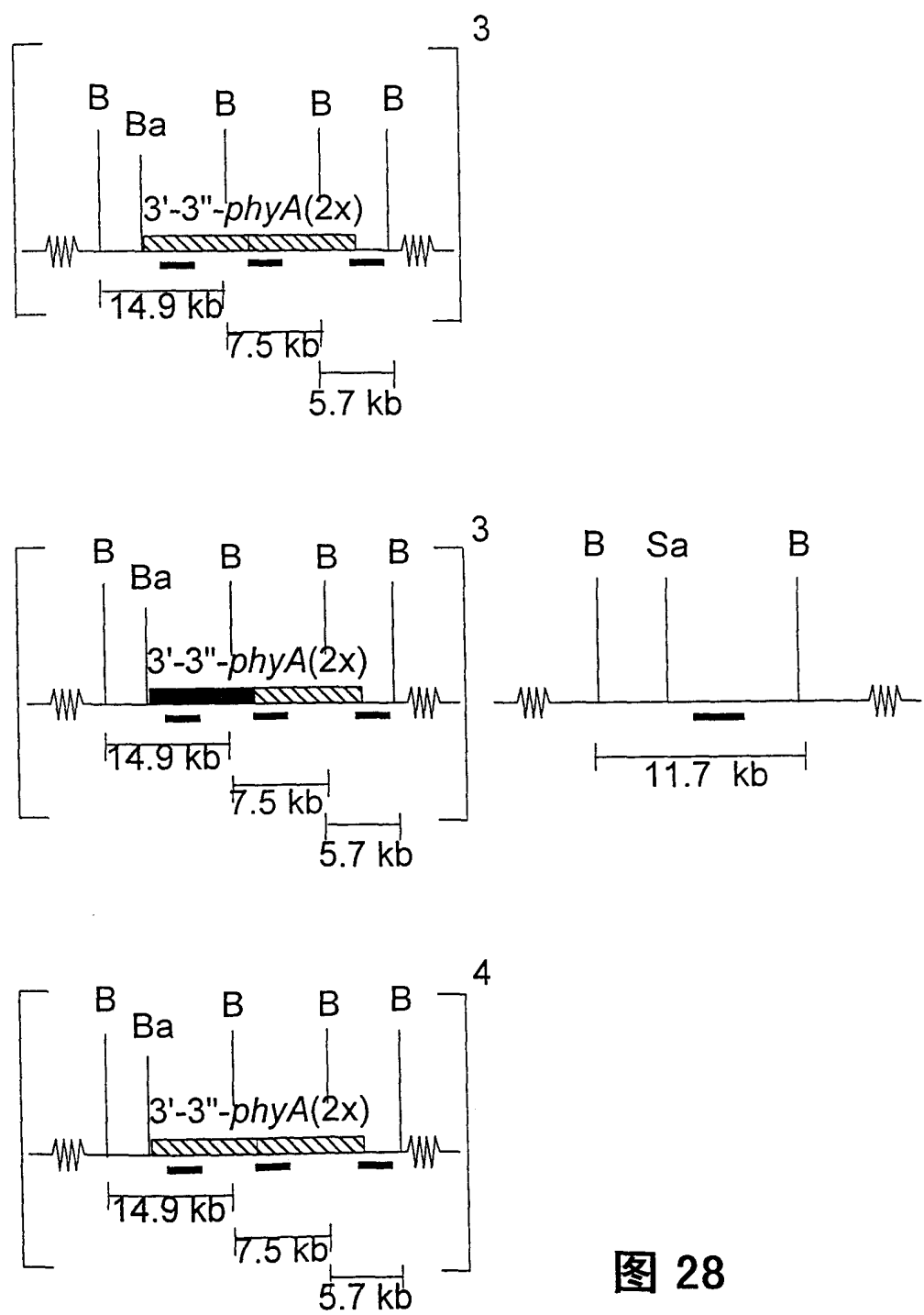


图 28

— 探针

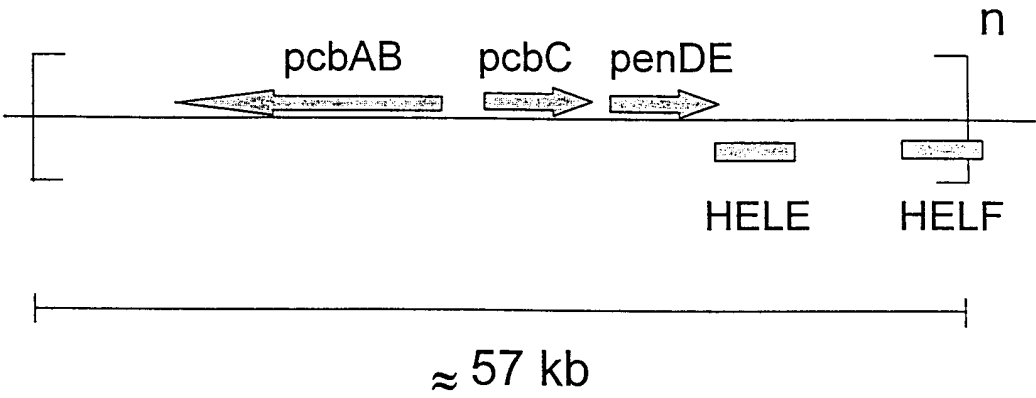
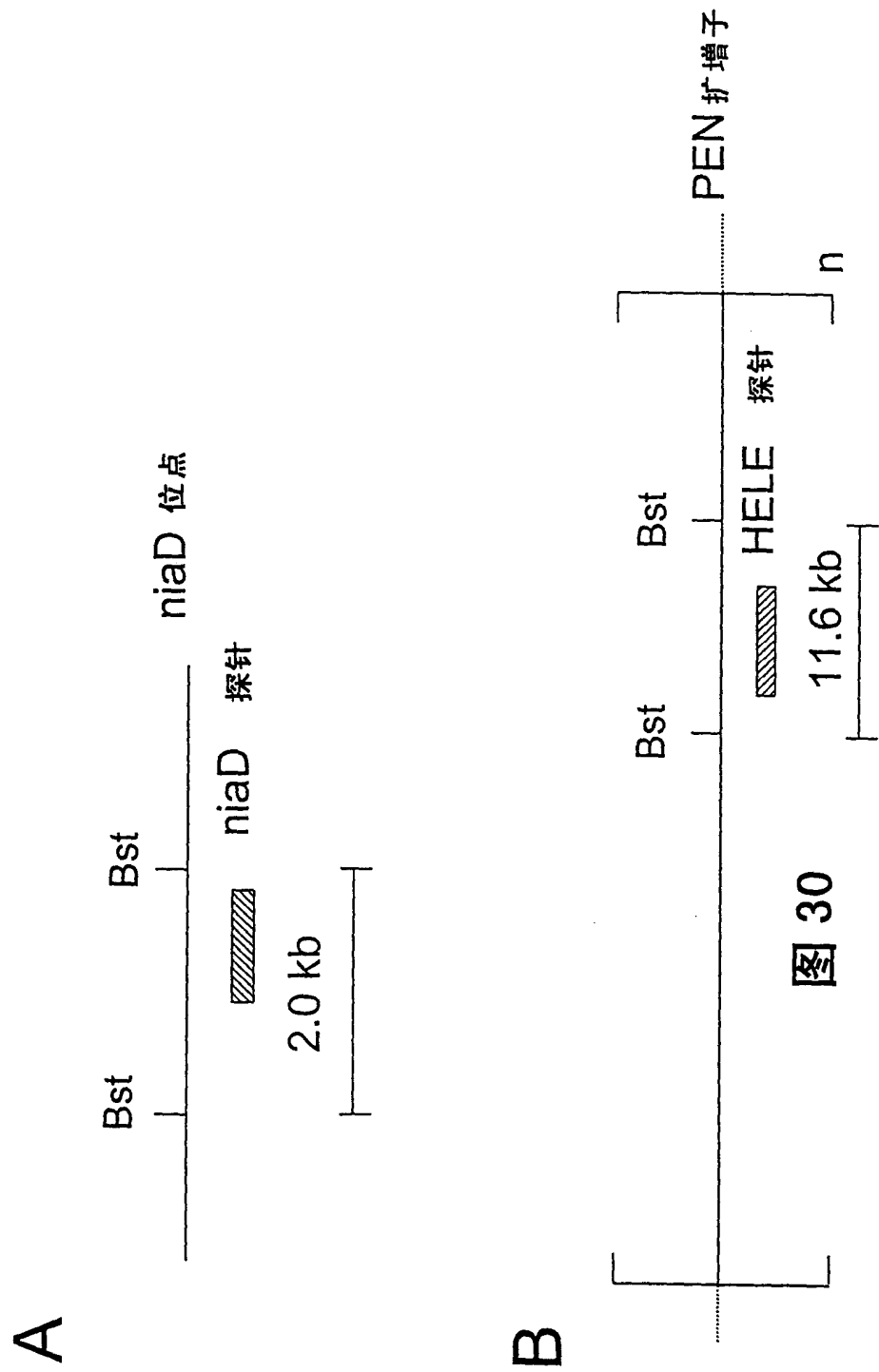


图 29



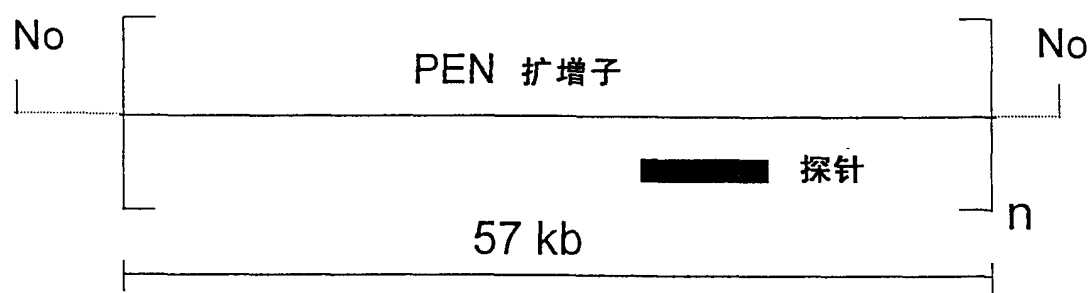


图 31

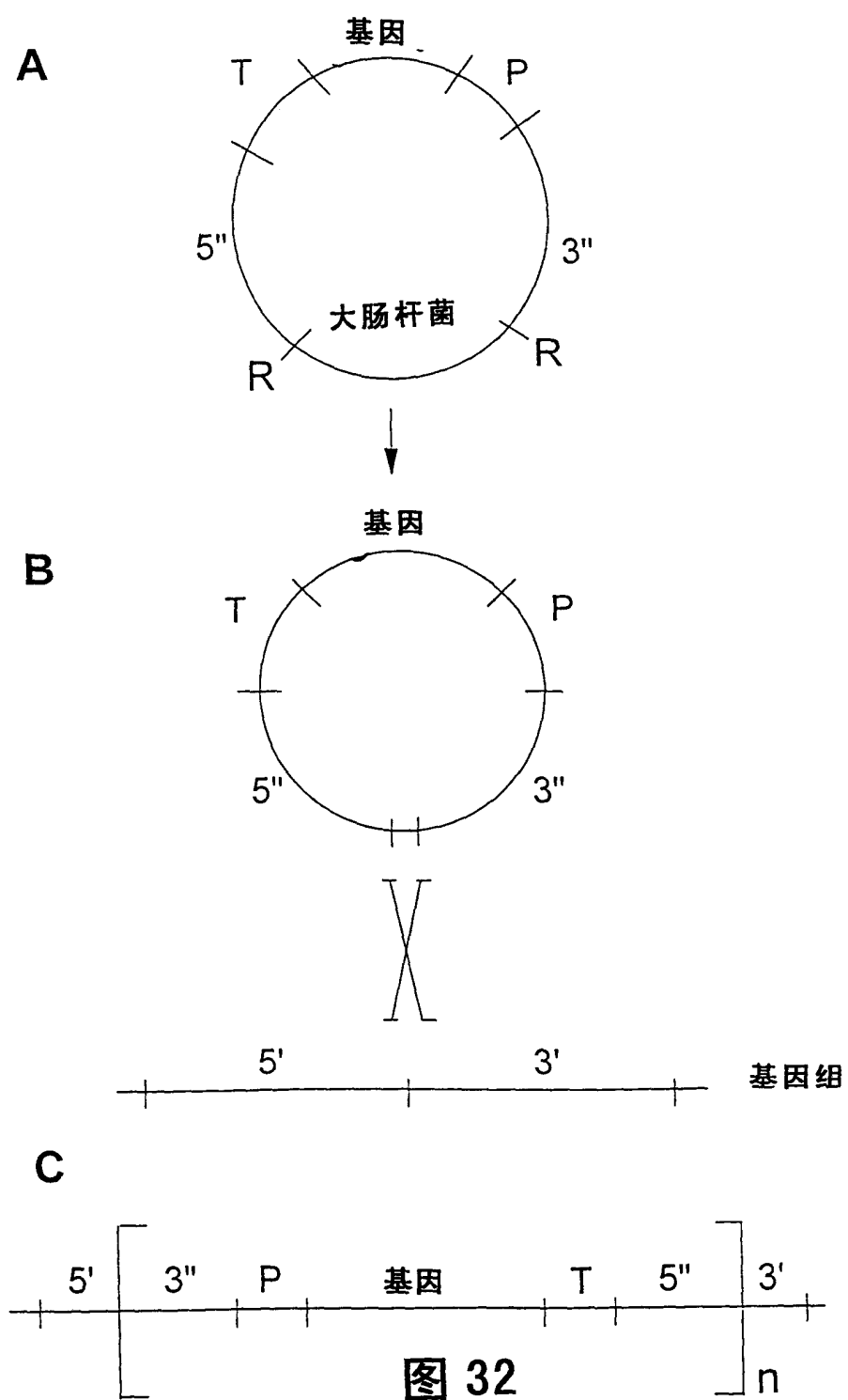


图 32

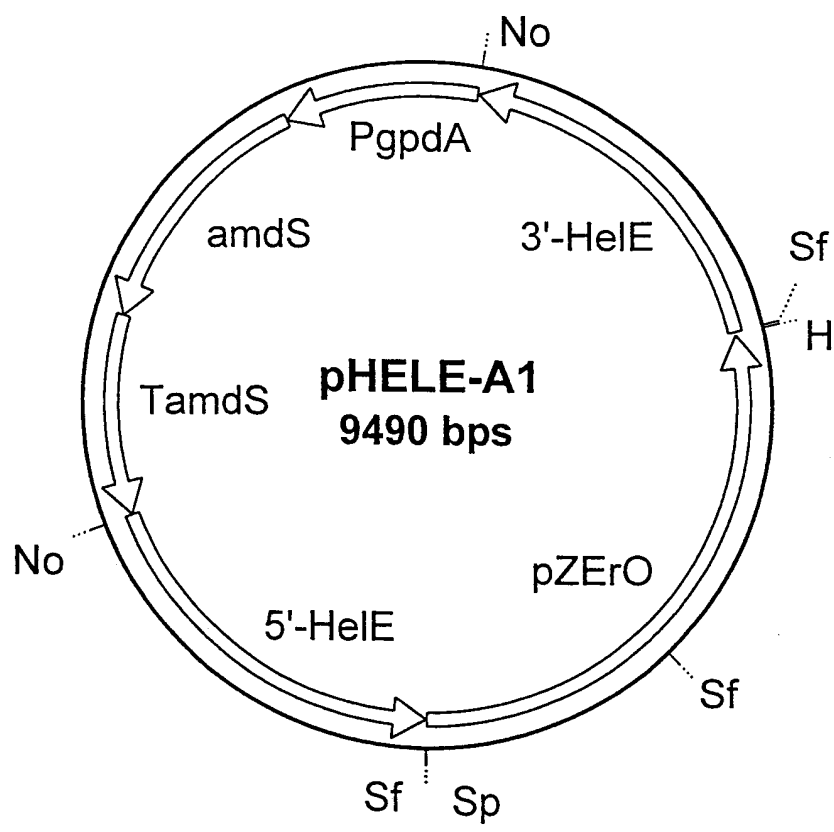
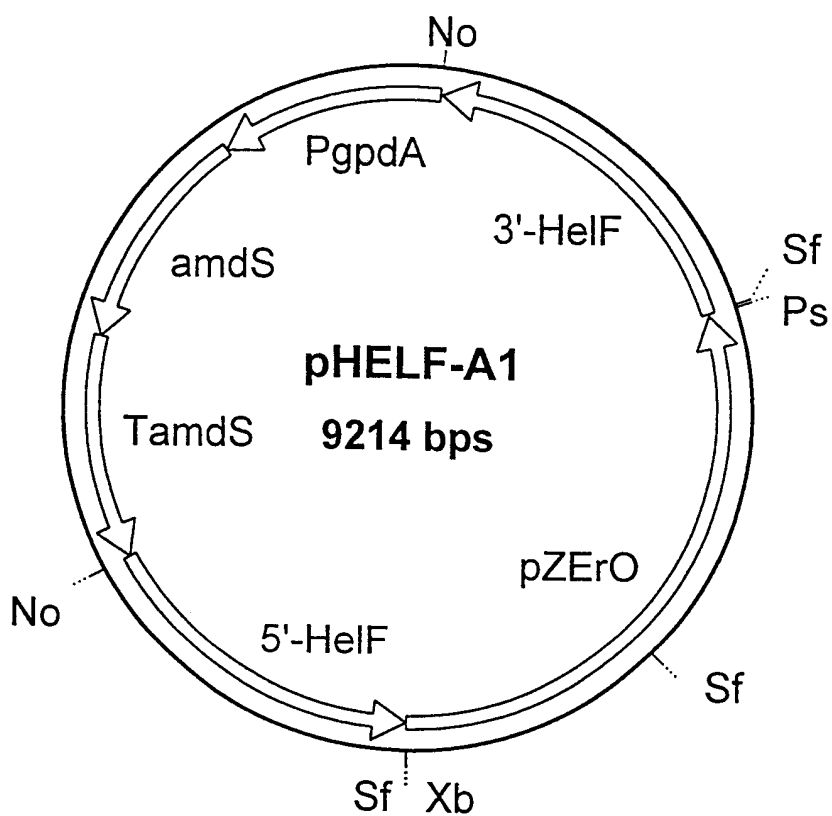


图 33

**图 34**

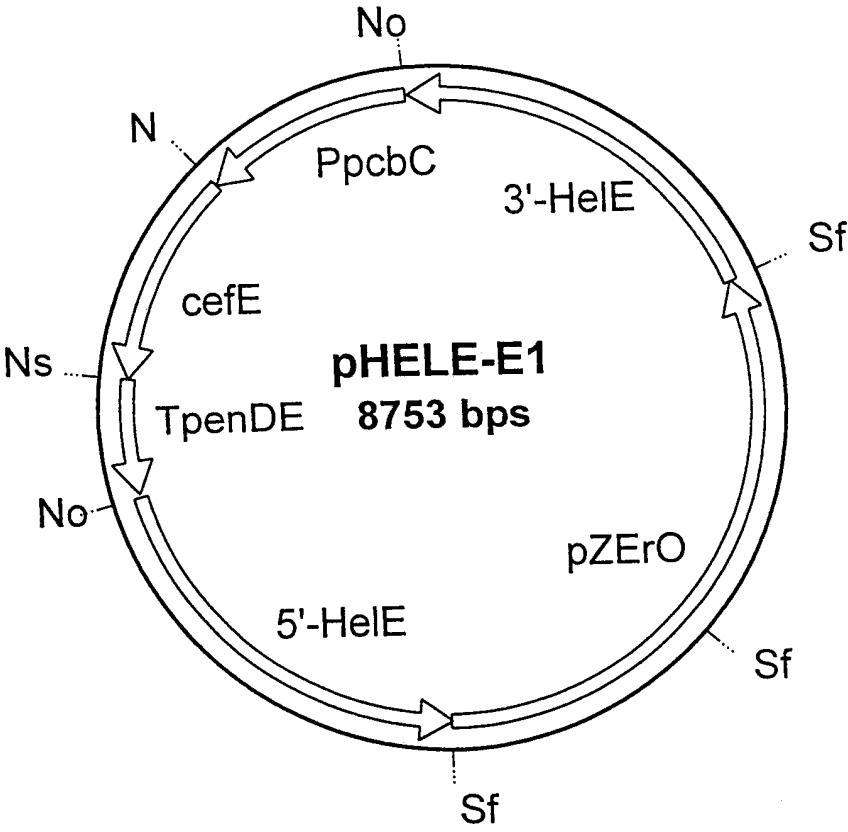
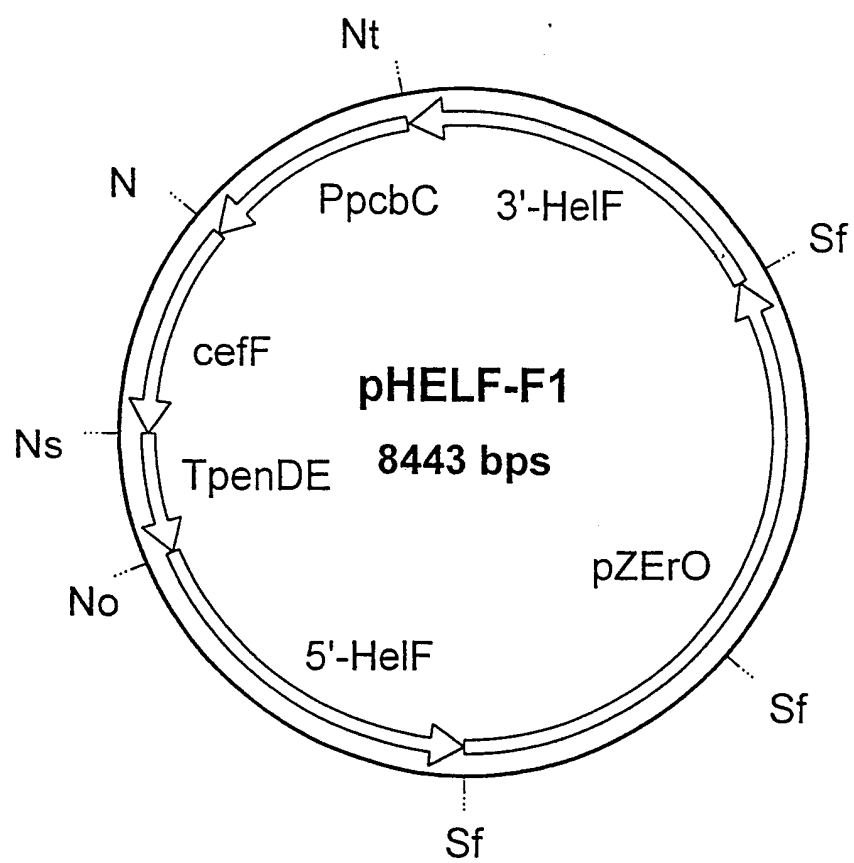


图 35

**图 36**

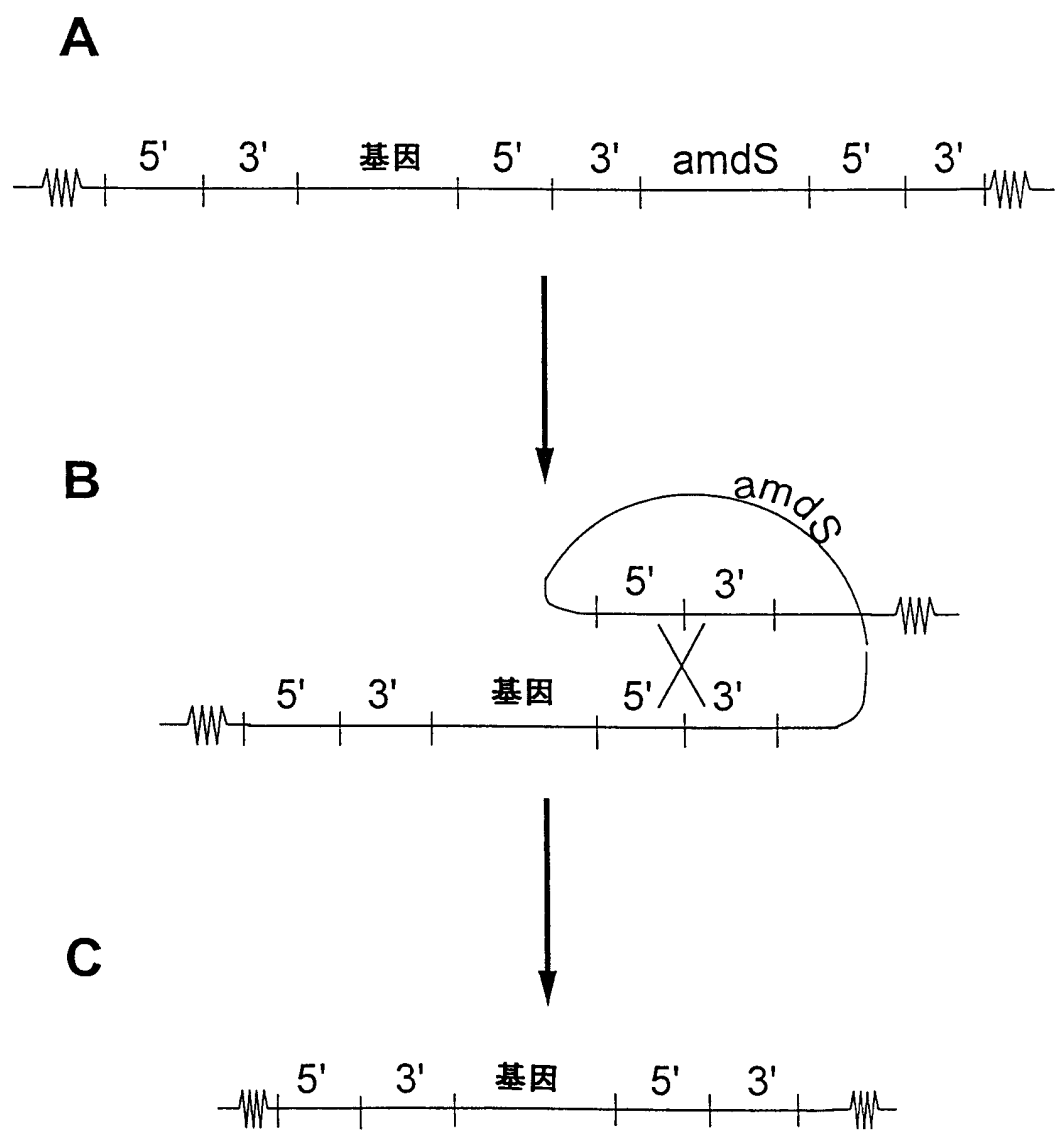


图 37

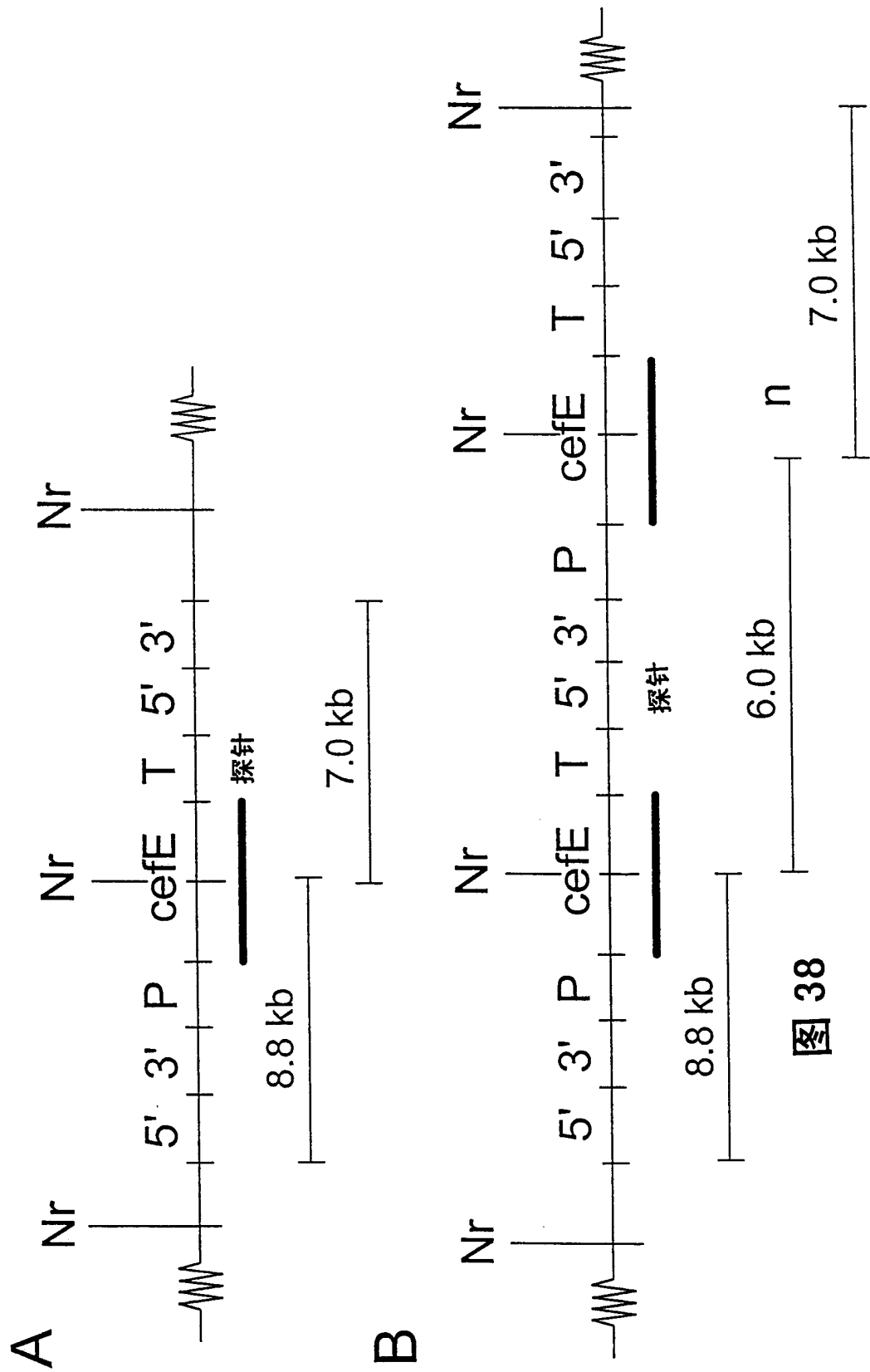


图 38

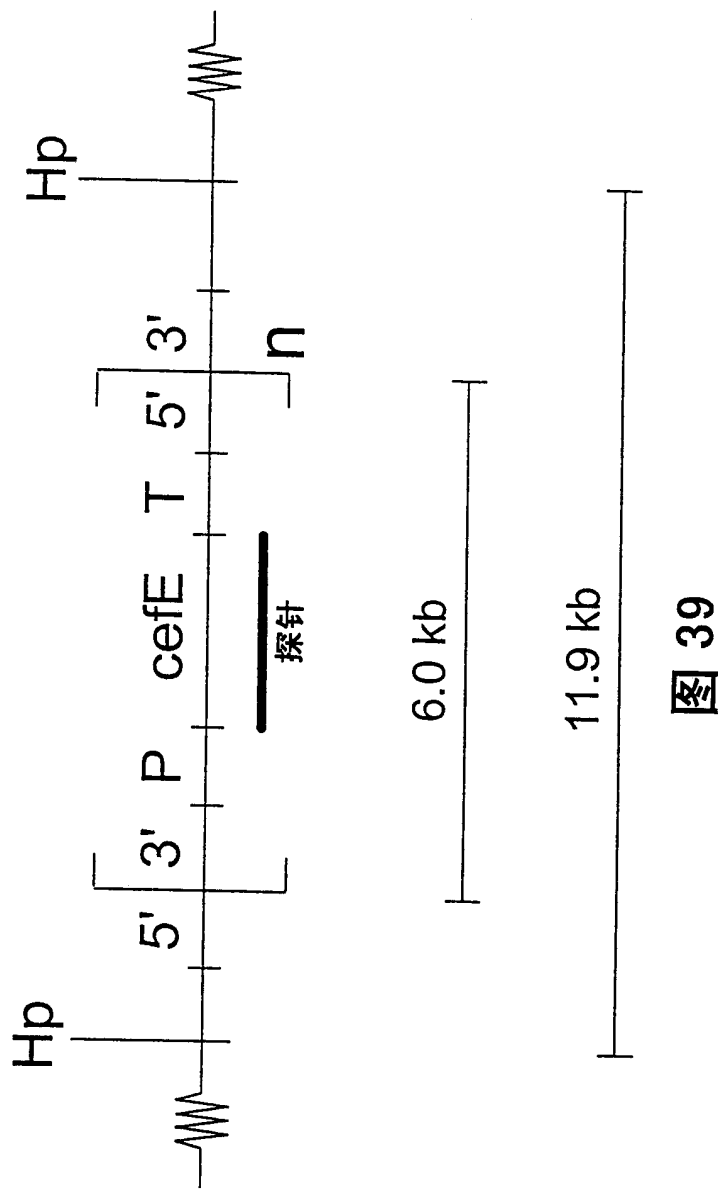


图 39

A



B

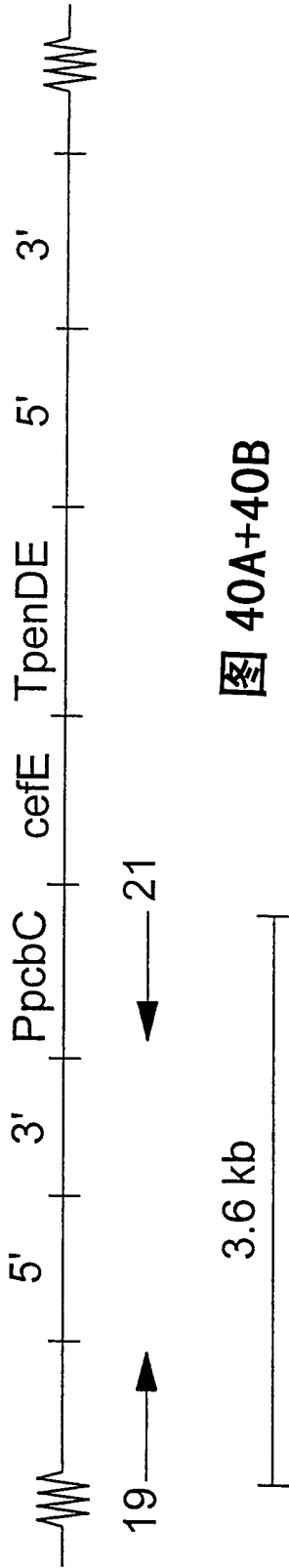


图 40A+40B

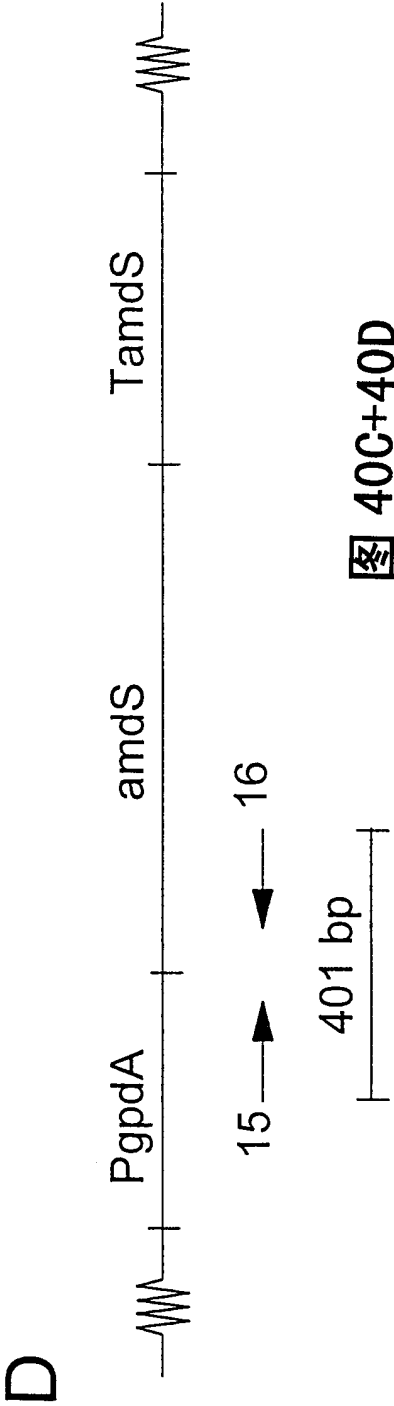
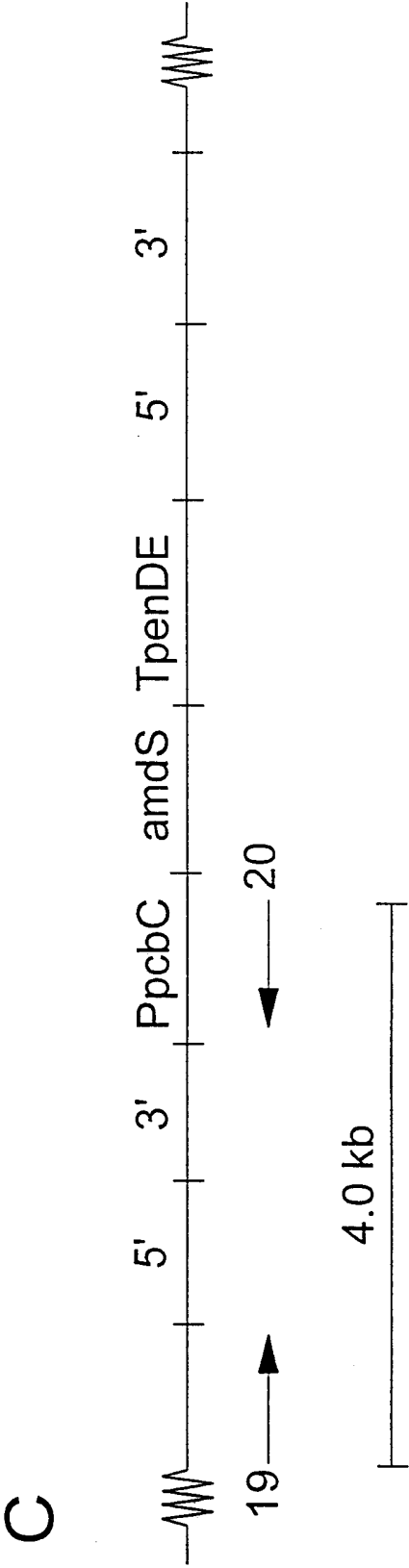


图 40C+40D

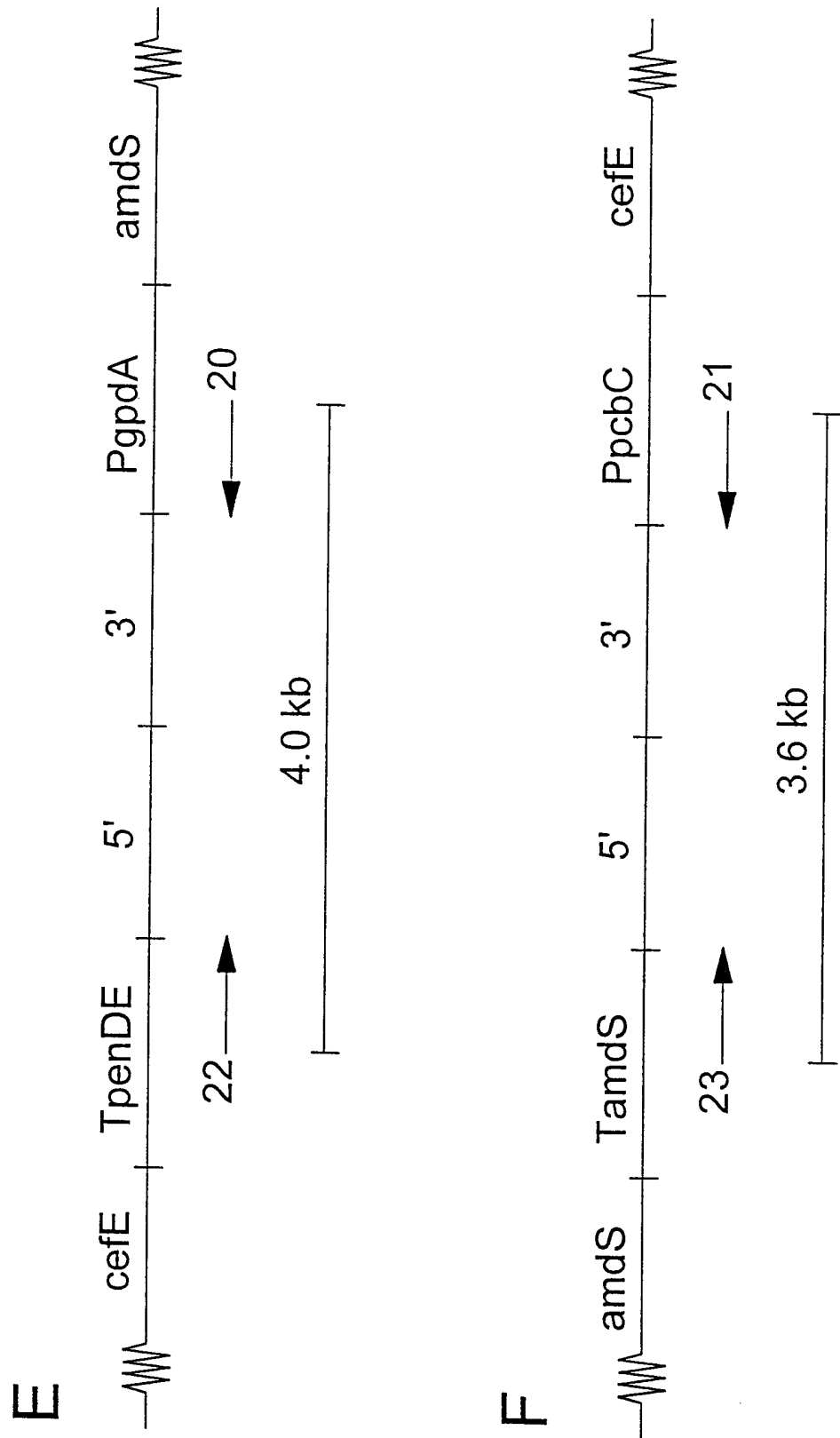


图 40E+40F

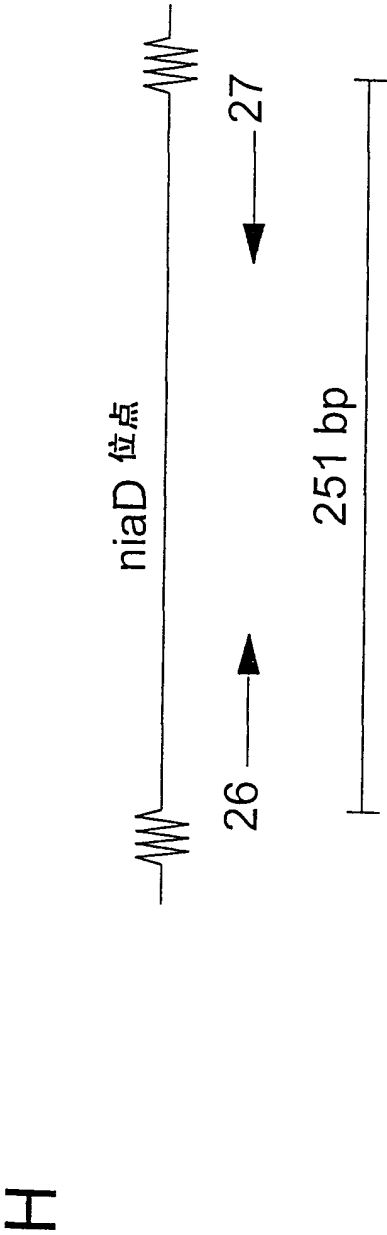
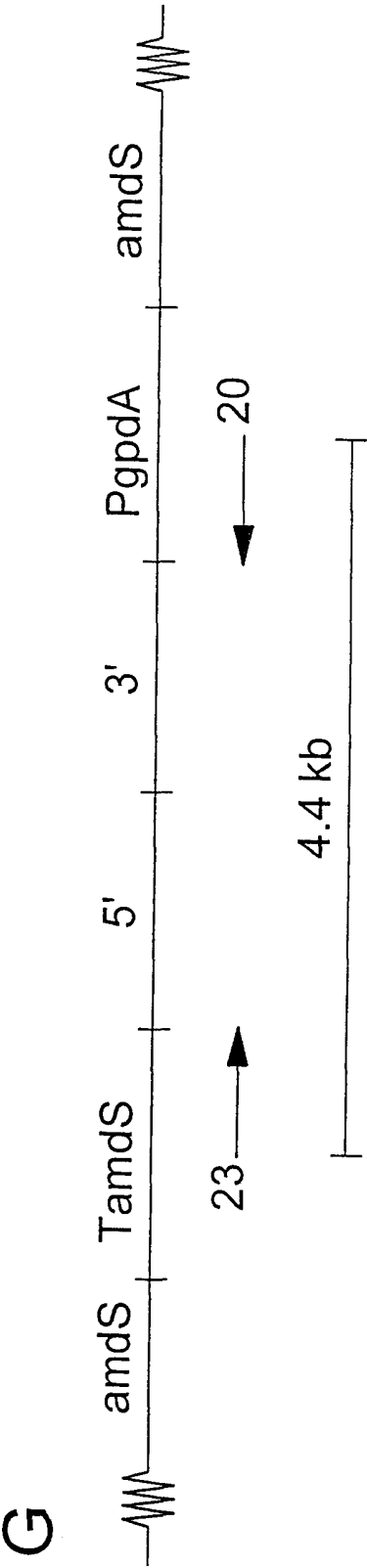


图 40G+40H

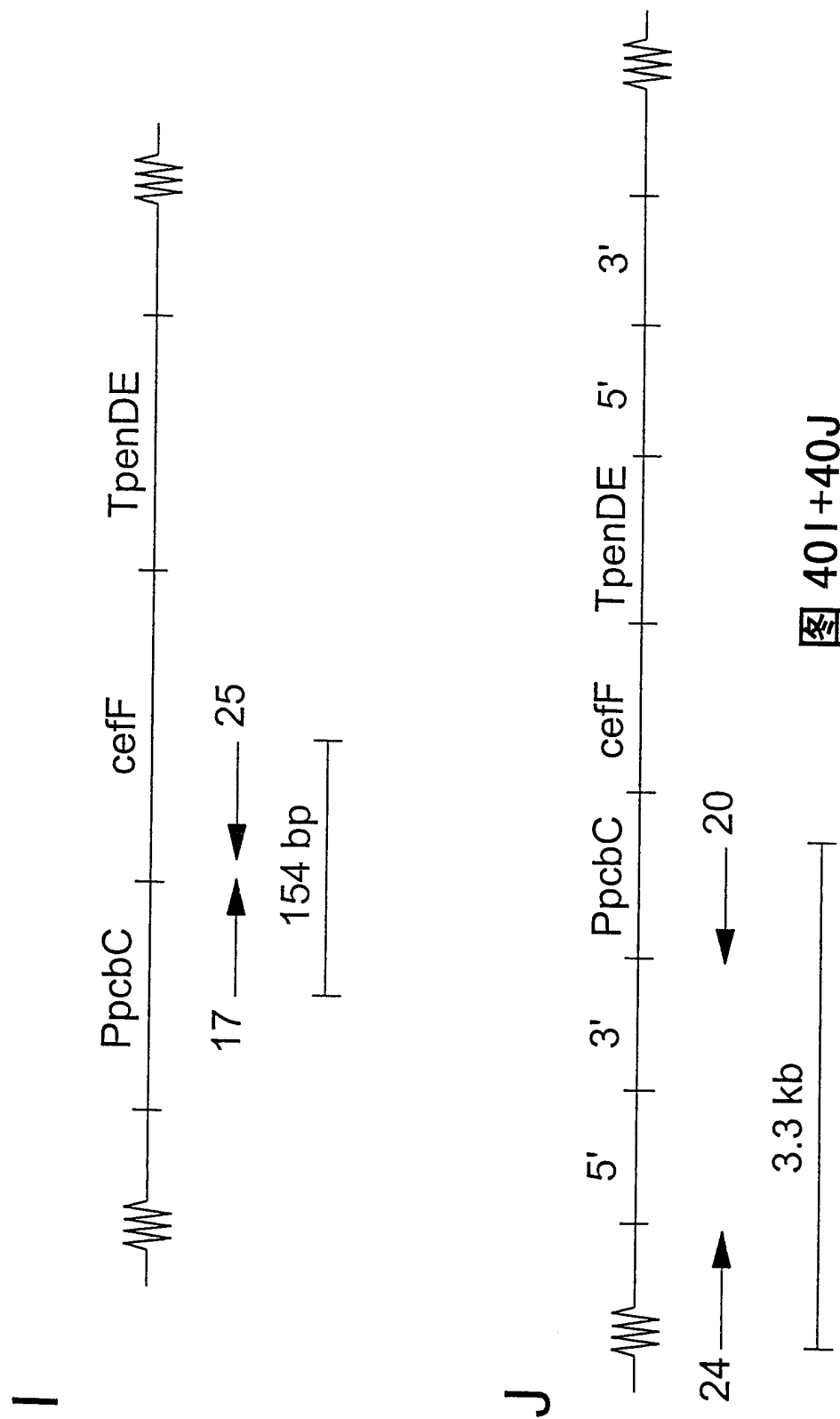
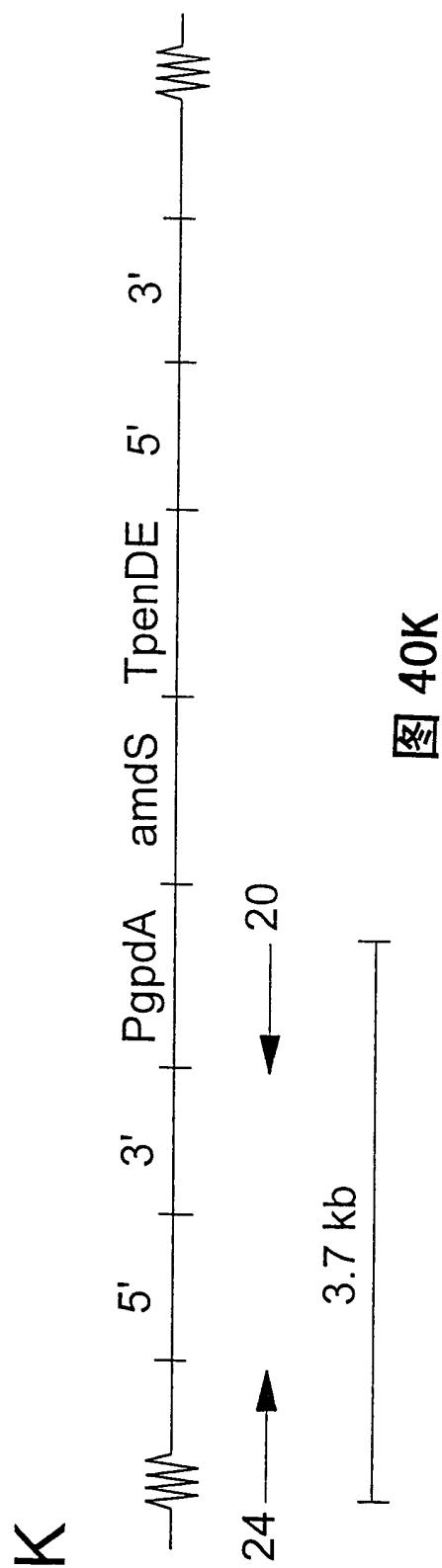
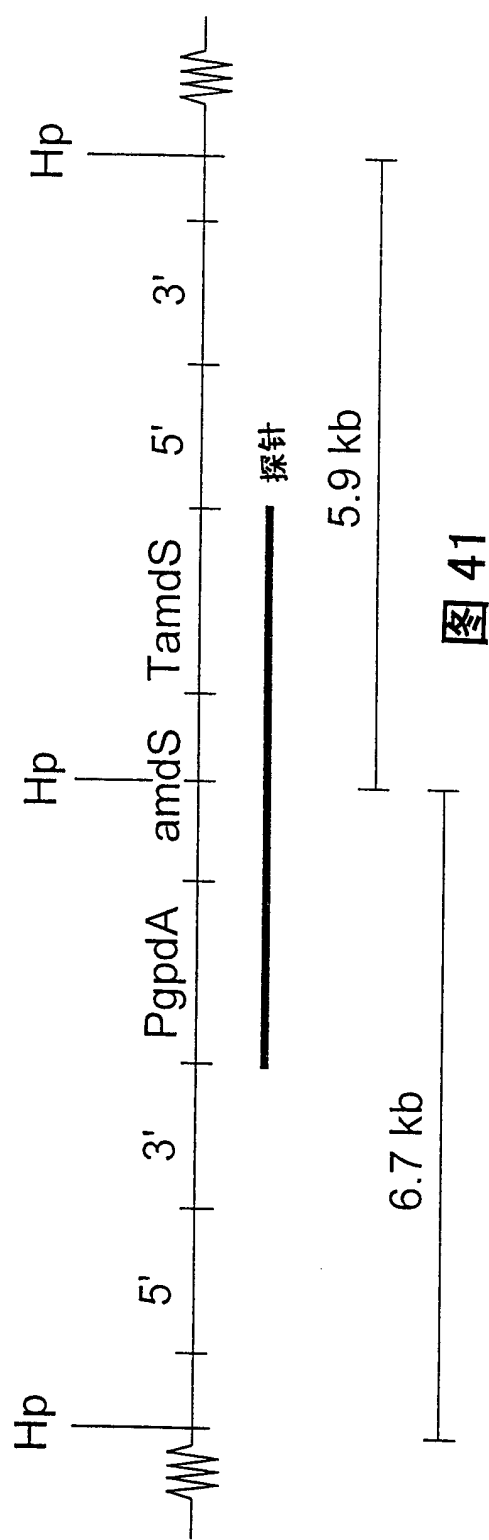
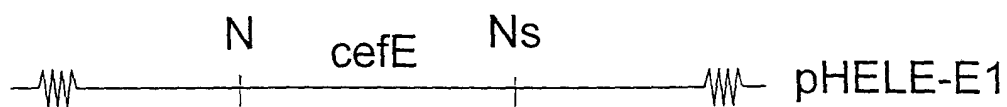


图 40I+40J

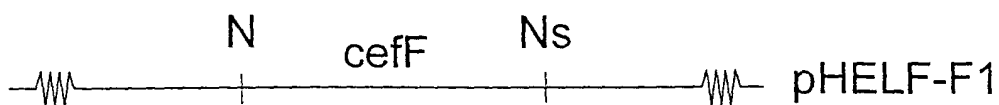




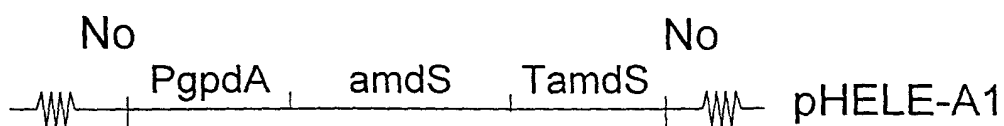
A



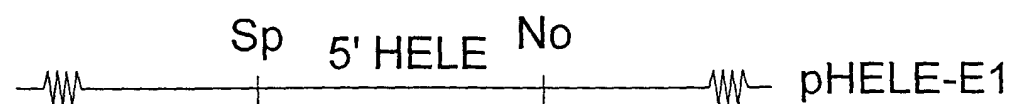
B



C



D



E

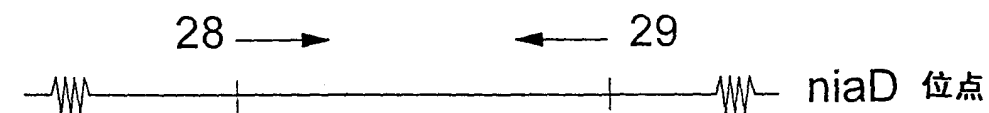
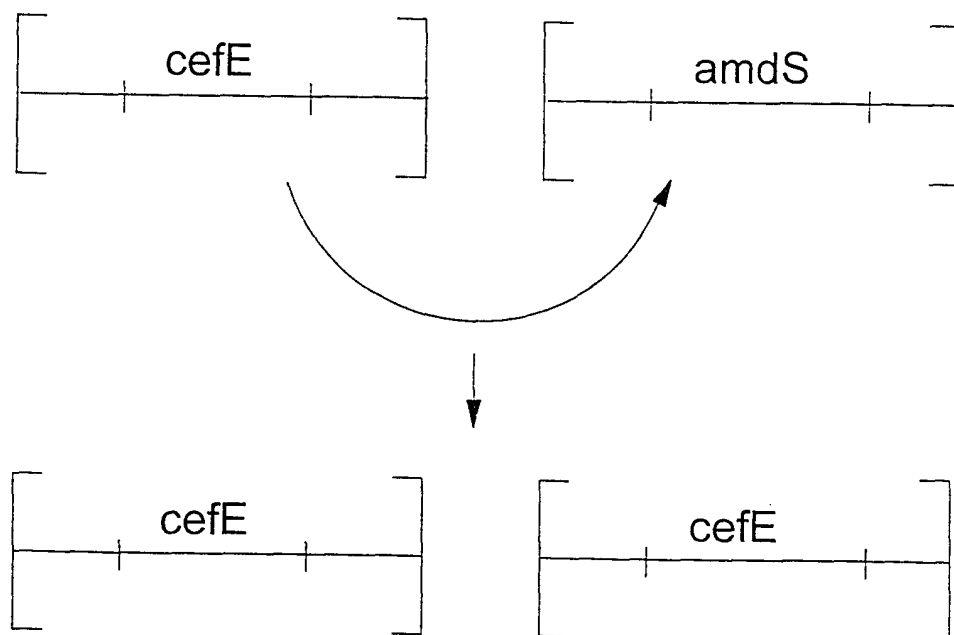


图 42

**图 43**

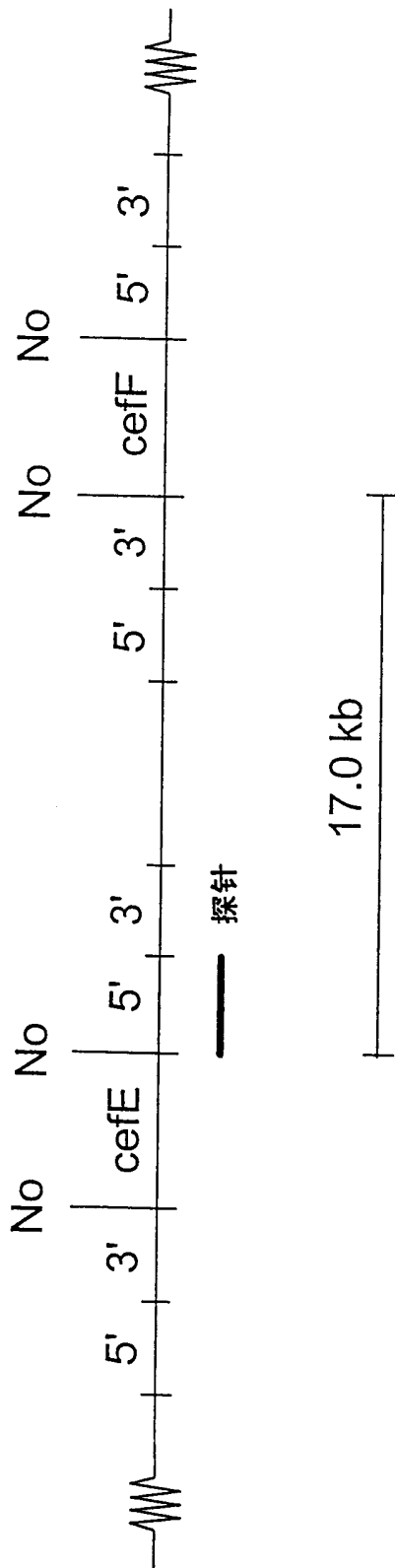
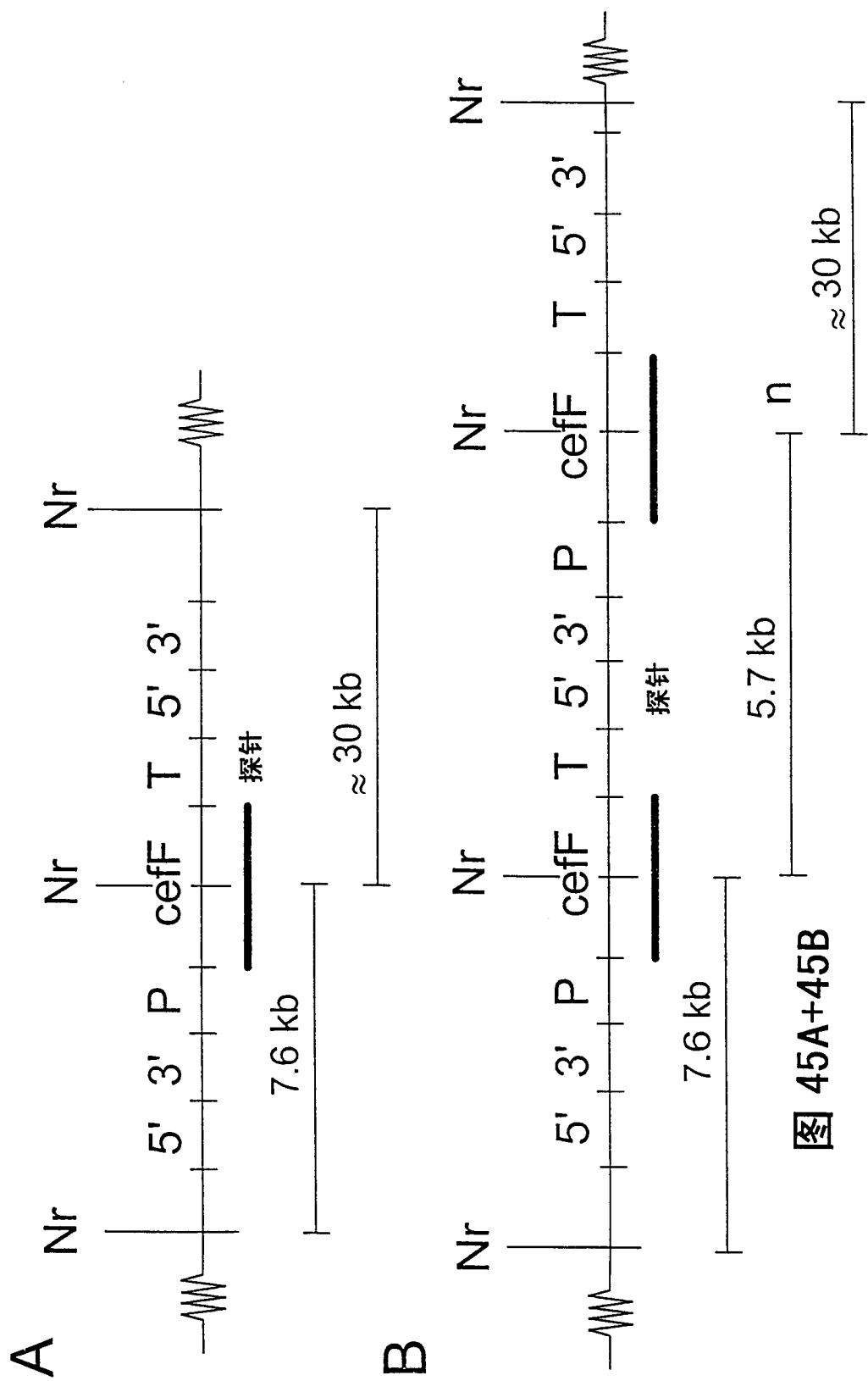
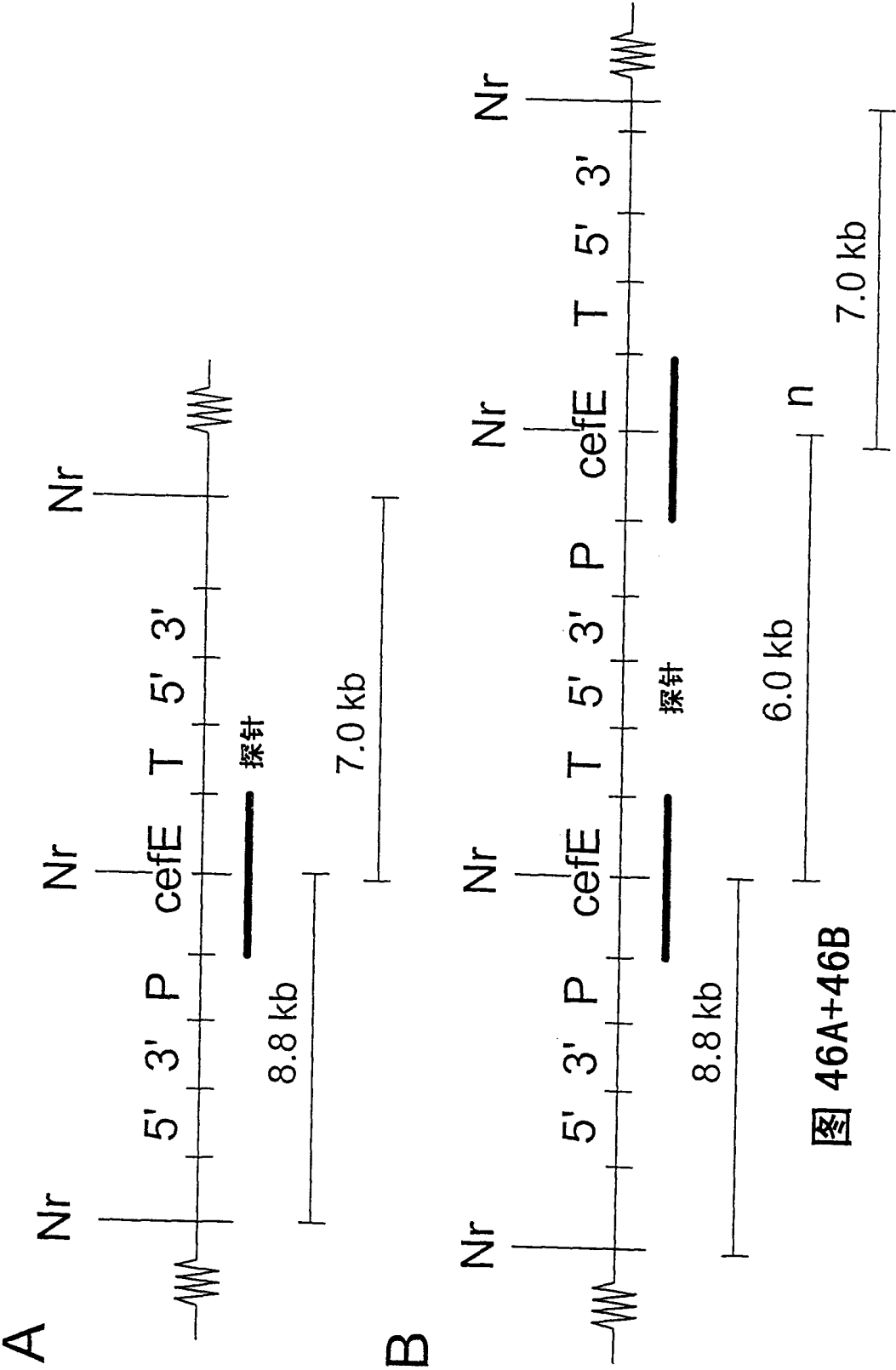


图 44







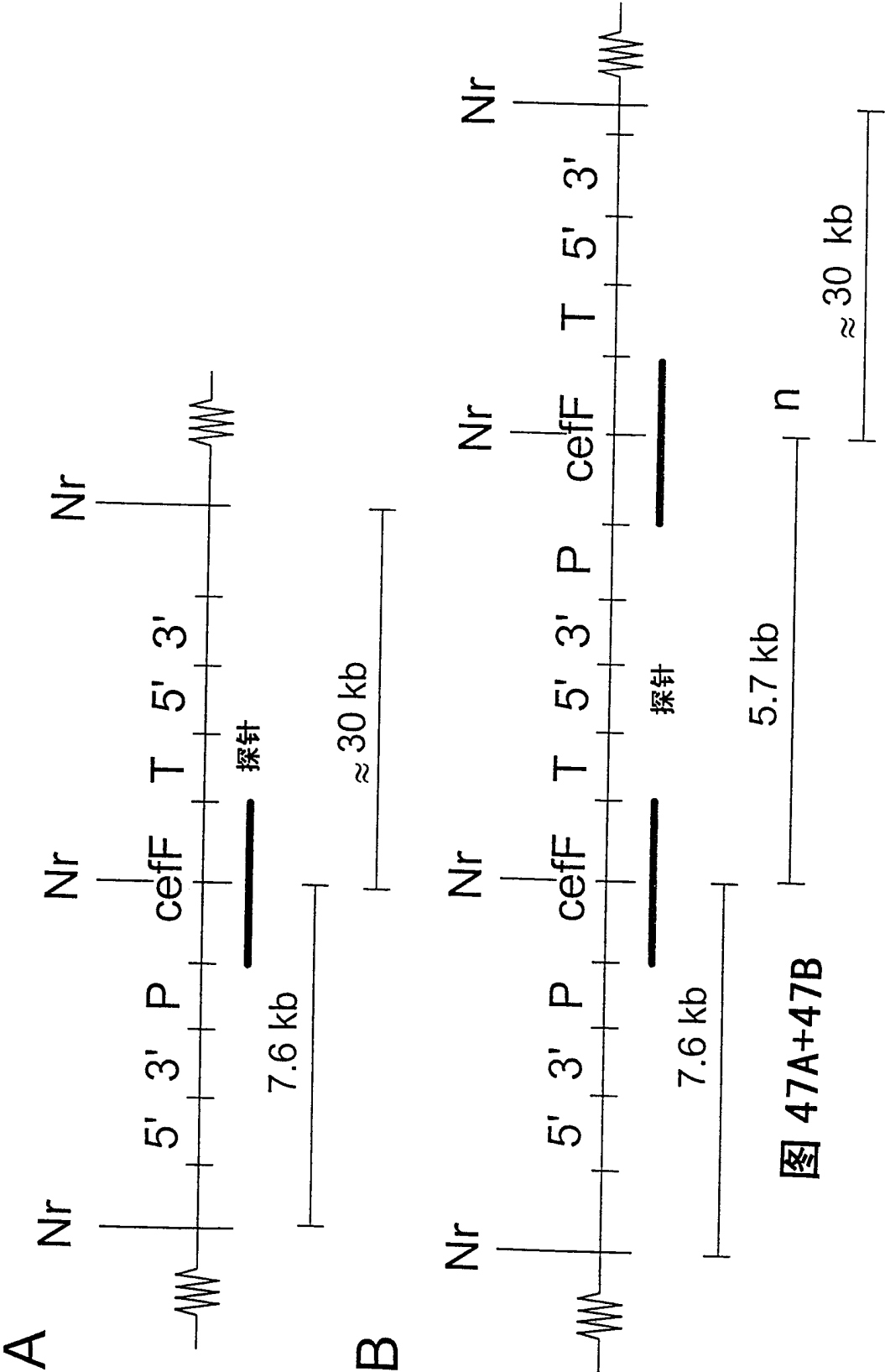


图 47A+47B

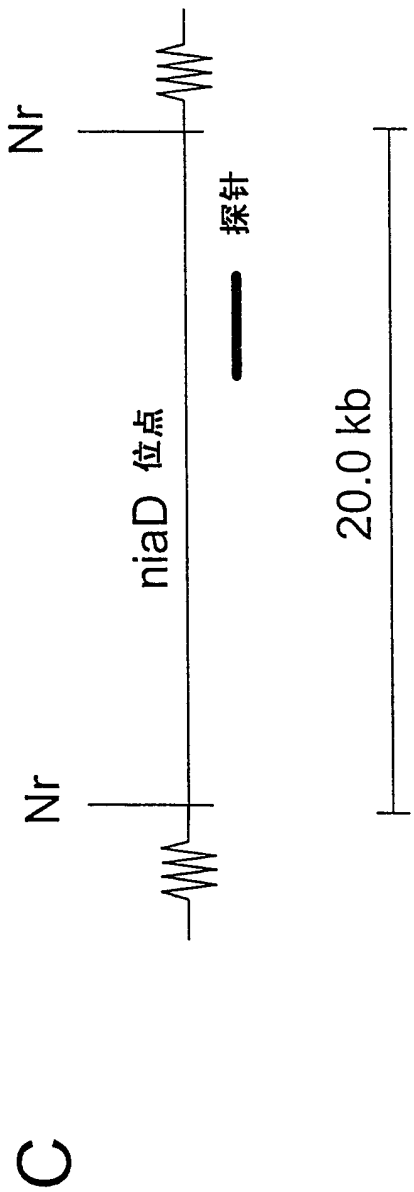


图 47C

